

**Mutationsanalyse im SCN1A-Gen bei frühkindlichen myoklonischen Epilepsien
unter besonderer Betrachtung der myoklonisch-astatischen Epilepsie und der
frühkindlichen Epilepsie mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen und
alternierendem Hemi-Grand mal**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Katharina Ebach
aus Bochum

Gießen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Abteilung für Neuropädiatrie und Sozialpädiatrie
Sozialpädiatrisches Zentrum
des Universitätsklinikums Gießen

Leiter: Prof. Dr. Bernd A. Neubauer

Gutachter: Prof. Dr. B. Neubauer

Gutachter: PD Dr. D. Nolte

Tag der Disputation: 07.09.2005

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Ebach K, Doose H, Stephani U, Kurlemann G, Neubauer BA (2004) Mutationen im Natriumkanalgen SCN1A bei frühkindlichen myoklonischen Epilepsien. *Neuropediatrics* 35:60 – Kongressbeitrag zur Jahrestagung der GNP 2004

Ebach K, Joos H, Doose H, Stephani U, Kurlemann G, Fiedler B, Hahn A, Hauser E, Hundt K, Holthausen H, Müller U, Neubauer BA (2005) SCN1A mutation analysis in Myoclonic Astatic Epilepsy and Severe Idiopathic Generalized Epilepsy of Infancy with Generalized Tonic Clonic Seizures. *Neuropediatrics* (im Druck)

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epilepsie	1
1.1.1	Frühkindliche myoklonische Epilepsien	2
	Myoklonisch-astatische Epilepsie (MAE)	2
	Schwere myoklonische Epilepsie des frühen Kindesalters (SMEI)	4
	Schwere frühkindliche Epilepsie mit generalisierten tonisch- klonischen Anfällen und alternierendem Hemi-Grand mal – Frühkindliche Grand mal-Epilepsie (FKGM)	5
	Vergleich der Unterformen	6
1.1.2	Genetik epileptischer Anfälle und Syndrome	8
	Molekulargenetische Befunde bei idiopathischen Epilepsien	8
	Genetik der Fieberkrämpfe (FS)	9
	Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS+)	10
	Frühkindliche myoklonische Epilepsien	11
1.2	Spannungsabhängiger Natriumkanal (SCN)	13
1.2.1	Physiologie und Pathophysiologie der α_1 -Untereinheit des zentral exprimierten Natriumkanals SCN1A	14
1.3	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Materialien und Methoden	16
2.1	Materialien	16
2.1.1	Geräte und Zubehör	16
2.1.2	Chemikalien	17
2.1.3	Lösungen	19
2.1.4	Software zur Sequenzanalyse	20
2.1.5	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen (Genbankverweise)	20
2.2	Methoden	20
2.2.1	DNA-Extraktion aus EDTA-Blut	20
2.2.2	Bestimmung und Einstellung der DNA-Konzentration	23
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.2.3.1	Amplifikation des SCN1A-Gens	25
2.2.4	Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA	26

2.2.5	DNA-Sequenzierung	27
2.2.6	Sequenzanalyse	28
2.2.7	Klonierung	29
2.2.8	Restriktionsanalyse	30
3	Studienpopulation	32
3.1	Diagnose und Zuordnung der Epilepsiesyndrome	32
3.2	Geschlechterverteilung	33
3.3	Verlauf und Outcome in der Gruppe der myoklonisch-astatischen Epilepsie	33
3.4	Betroffene Geschwisterpaare	34
3.5	Exemplarische Fallgeschichten	34
3.5.1	Patientin 1 (Myoklonisch-astatische Epilepsie)	34
3.5.2	Patientin 2 (Schwere myoklonische Epilepsie des Kindesalters)	36
3.5.3	Patient 3 (Frühkindliche Grand mal-Epilepsie)	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Exons ohne Sequenzabweichung (Sequenzanalyse des SCN1A-Gens)	39
4.1.1	Exon 14	40
4.2	Exons mit Sequenzabweichungen	40
4.2.1	Exon 9	41
4.2.2	Exon 10	44
4.2.3	Exon 13	45
4.2.4	Exon 15	46
4.2.5	Exon 16	47
4.2.6	Exon 18	48
4.2.7	Exon 25	50
4.2.8	Exon 26	51
5	Diskussion	53
5.1	Polymorphismen	53
5.2	Mutationen	55
5.2.1	Myoklonisch-astatische Epilepsie	56
5.2.2	Schwere myoklonische Epilepsie des Kindesalters	57
5.2.3	Frühkindliche Grand mal-Epilepsie	59

5.2.4	Vergleich der Unterformen	60
5.3	Weiterführende Untersuchungen	63
6	Zusammenfassung	65
7	Summary	67
8	Literaturverzeichnis	69
	Anhang	85
Anhang A	Tabellen und Übersichten	85
Anhang B	Abkürzungen	98
	Lebenslauf	101
	Danksagung	102

1 Einleitung

1.1 Epilepsie

„Heilige Krankheit“, „vom Dämon besessen“ – epileptische Anfälle sind Ausdruck spontaner paroxysmaler synchroner Entladungen zentraler Neuronenverbände. 10 % aller Menschen erleiden im Laufe ihres Lebens einen solchen Anfall. 2 bis 3 % erkranken an einer Epilepsie, also rezidivierend unprovokiert auftretenden zerebralen Krampfanfällen (Hauser et al., 1996).

Klassifiziert werden die verschiedenen Formen epileptischer Anfälle und Syndrome nach einem System der ILAE – International League against Epilepsy. Dieses unterscheidet zunächst einmal auf ätiologischer Ebene: *Symptomatischen* Epilepsien liegen morphologisch fassbare Veränderungen des Hirngewebes zugrunde, oder sie sind Teil einer übergeordneten Erkrankung, die weitere neurologische Auffälligkeiten oder Störungen anderer Organsysteme beinhaltet. *Idiopathische* Epilepsien hingegen weisen eine genetische Ätiologie auf und sind mit keinen über die Epilepsie hinaus gehenden neurologischen Symptomen oder Störungen anderer Organsysteme assoziiert. *Kryptogene* oder synonym *vermutlich symptomatische* Epilepsien sind solche, deren Zuordnung zu einer der zuvor genannten Gruppen nicht sicher möglich, bei denen eine symptomatische Ursache aber wahrscheinlich ist (Commission 1989, Engel, 2001). Die andere grundlegende Einteilung betrifft die Symptomatologie der Anfälle und unterscheidet zwischen *generalisierten* – synchrone Beteiligung beider Hirnhälften – und *fokalen* – auf ein Hirnareal beschränktes Geschehen – Anfällen.

Myoklonische Anfälle kommen in allen der genannten Rubriken vor (Aicardi & Chevrie, 1971). Die folgende Arbeit befasst sich mit den frühkindlichen myoklonischen Epilepsien, einer Untergruppe idiopathischer generalisierter Epilepsiesyndrome.

Zunächst sollen daher klinische und familienanamnestische Aspekte dieser Syndrome im Einzelnen und im Vergleich zueinander dargestellt werden.

1.1.1 Frühkindliche myoklonische Epilepsien

Myoklonien sind ein Phänomen, das im Rahmen diverser neurologischer Erkrankungen beobachtet wird. Es handelt sich dabei um repetitive, maximal 150 ms dauernde Innervationen einzelner Muskelgruppen (z.B. Weber et al., 2002).

Eine besondere Gruppe bilden hier die idiopathischen generalisierten frühkindlichen myoklonischen Epilepsien. Dazu gehören die myoklonisch-astatische Epilepsie, die schwere myoklonische Epilepsie des Kindesalters und die schwere frühkindliche Epilepsie mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen und alternierendem Hemi-Grand mal oder auch frühkindliche Grand-Mal-Epilepsie genannt (Doose, 1995).

Familienuntersuchungen belegen die genetische Ursache dieser Epilepsiesyndrome und lassen eine polygene Determination erkennen (Doose, 1992b). Es zeigen sich nämlich einige den Epilepsiesyndromen gemeinsame Charakteristika: Eine Hirnfehlbildung oder perinatale Schädigung liegt nicht vor, die Kinder weisen eine unauffällige Vorgeschichte und Entwicklung auf. Neurologische, metabolische oder neuroradiologische Auffälligkeiten fehlen. Die Familienanamnese ist in ca. 30 % positiv, wobei sowohl Angehörige mit unterschiedlichen Formen generalisierter Epilepsien oder Fieberkrämpfen als auch klinisch gesunde Verwandte mit epilepsietypischen EEG-Veränderungen wie spike waves, Photosensibilität oder persistierenden Thetarhythmen gefunden werden (Doose et al., 1970, Fujiwara et al., 1990). Eine weitere Gemeinsamkeit der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien ist die in vielen Fällen zu findende Temperaturabhängigkeit, die dadurch erkennbar wird, dass Anfälle durch erhöhte Körpertemperatur bei Fieber oder manchmal auch heißem Baden provoziert werden (Fukuda et al., 1997).

Myoklonisch-astatische Epilepsie (MAE)

Die myoklonisch-astatische Epilepsie ist ein zuerst von Doose definiertes und den primär generalisierten frühkindlichen Epilepsien zugeordnetes Epilepsiesyndrom (Doose, 1992b), das auch Aufnahme in die internationale Klassifikation gefunden hat (Commission, 1989).

Zur Erstmanifestation kommt es in der Regel bei bis dahin unauffälligen Kindern vor dem sechsten Lebensjahr, wobei bei 24 % der Betroffenen der erste Anfall bereits im

ersten Lebensjahr auftritt. Etwa zwei Drittel der Anfälle sind generalisiert tonisch-klonisch (GTCS), davon wiederum die Hälfte von Fieber begleitet. Das letzte Drittel bilden sogenannte kleine Anfälle aus Absencen und myoklonischen Anfällen, wobei hier die Kinder im Alter um das fünfte Lebensjahr überrepräsentiert sind (Doose, 1992b).

Der dominierende Anfallstyp einer MAE sind myoklonisch-astatische Anfälle, bei denen auf eine Myoklonie, meist im Schulter-Arm-Bereich, eine Muskelatonie folgt. Je nach Ausgangsposition des Kindes und den beteiligten Muskelgruppen führt dieses zu kurzem Einknicken in den Beinen, Vorfallen des Kopfes oder Loslassen festgehaltener Gegenstände oder auch zu gefährlichen Stürzen. Auch isolierte Myoklonien oder astatische Anfälle kommen vor. Bei 75 % der Betroffenen sind generalisierte tonisch-klonische Anfälle mit oder ohne Fieber zu beobachten. Das Auftreten von myoklonischen Absencen und Staten mit multiplen kurzen myoklonischen Anfällen, Serien astatischer Anfälle und Apathie, die eine zeitliche Bindung an das Aufwachen zeigen, ist nicht selten (Doose, 2002) und dann oft Anzeichen für einen ungünstigen Verlauf (Kaminska et al., 1999).

Der Verlauf dieser Erkrankung zeigt feste Muster, auch wenn die Spannweite von rascher und dauerhafter Anfallsfreiheit, teilweise auch nach Absetzen der Medikation, bis zur Therapieresistenz und Entwicklung einer schweren geistigen Behinderung reicht. Die Entwicklung neurologischer Defizite wie einer milden Ataxie und koordinatorschen Unbeholfenheit findet sich häufig. Nach den bisherigen Erfahrungen gilt, dass unter der heute verfügbaren Therapie fast die Hälfte der Kinder anfallsfrei und mental unbeeinträchtigt bleibt. Ob und in welche Richtung einer positiven Familienanamnese für Epilepsien eine prognostische Aussagekraft zukommt, ist umstritten (Oguni et al., 2002).

Im EEG zeigt sich interiktal zunächst ein unauffälliger Befund, nach kurzer Zeit entwickelt sich die charakteristische Theta-Rhythmisierung. Irreguläre spikes and waves sind zunächst nur im Schlaf zu finden. Treten dann die häufigen kleinen generalisierten Anfälle auf, kommt es auch im EEG zu einer deutlichen Änderung. Hier erscheinen nun Gruppen von bilateralen 2-3 Hz spikes and waves, unterbrochen von amplitudenhohen langsamen Wellen, und polyspikes and waves (Oguni et al., 2001a; Bonnani et al., 2002).

Insgesamt macht die MAE 1-2 % der Epilepsien vor dem neunten Lebensjahr aus, Jungen sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Mädchen (Doose & Baier, 1987).

Schwere myoklonische Epilepsie des frühen Kindesalters (SMEI)

Die schwere myoklonische Epilepsie im Kindesalter – severe myoclonic epilepsy in infancy – wurde 1978 von Dravet erstmalig eingehend untersucht und 1992 dann unter diesem Namen beschrieben (Dravet, 1978, 1992).

Zur Erstmanifestation kommt es in der Regel bei bis dahin vollkommen unauffälligen Säuglingen in einem Alter von durchschnittlich sechs Monaten. Zu 55 % handelt es sich dabei um einen fiebergeordneten Krampfanfall (Nabbout et al., 2003a), der durch eine Seitenbetonung (Hemi-Grand mal) und eine lange Dauer bis hin zu einem Status kompliziert wird. Oft kommt es rasch zu weiteren Anfällen – nicht selten mit wechselnder Lateralisation, wobei es sich hierbei nicht um fokale Anfälle handelt, sondern um eine für das frühe Kindesalter spezifische Form generalisierter Anfälle, die aber aufgrund der noch inkompletten Interhemisphärenverknüpfung lateralisiert imponiert. Liegt kein Fieber vor, finden sich häufig anders herbei geführte Erhöhungen der Körpertemperatur (Oguni et al., 2001b) oder Impfungen im Vorfeld. Die Temperatursensibilität ist ein sehr typisches und konstantes Phänomen dieser Epilepsie. So sind nach der Studie von Nabbout und Mitarbeitern (2003a) bei knapp der Hälfte der Kinder die Anfälle temperaturspezifisch. Ist der erste Anfall myoklonisch oder fokal, so folgt meist kurz darauf ein generalisierter tonisch-klonischer Krampfanfall. Neben den febrilen und afebrilen GTCS und den nahezu obligatorischen myoklonischen Anfällen, die teilweise in statenhafter Häufung auftreten, kommt es bei 70 % der Kinder im Verlauf zu fokalen Anfällen (Nabbout et al., 2003a). Auch interiktale Myoklonien werden fast regelhaft beobachtet.

Die Prognose ist in der Regel ungünstig. Die Kinder zeigen regelhaft eine deutliche psychomotorische Retardierung und entwickeln im Verlauf neben zerebralen Bewegungsstörungen eine mentale Behinderung unterschiedlichen Ausmaßes. Todesfälle, die auf die Epilepsie zurückzuführen sind, werden von Dravet und Mitarbeitern (1992) mit einer Häufigkeit von knapp 16 % in der von ihr beobachteten Gruppe angegeben; die Todesursache bleibt oft unklar, Komplikationen nächtlicher GTCS sind zumindest bei einigen Kindern zu vermuten.

Bei der Exploration der Familien der betroffenen Kinder finden sich in einem Viertel bis zwei Dritteln weitere nahe Angehörige mit Epilepsien oder Fieberkrämpfen (Dravet et al., 1992; Benlounis et al., 2001; Bonnani et al., 2004).

Die Inzidenz der SMEI liegt bei 1:20.000 – 40.000 (Hurst, 1990). Sie macht vermutlich ein Drittel der myoklonischen Epilepsien im Kindesalter aus (Dravet, 1978).

Schwere frühkindliche Epilepsie mit generalisierten tonisch-klonischen Anfällen und alternierendem Hemi-Grand mal – Frühkindliche Grand mal-Epilepsie (FKGM)

Diese Form der frühkindlichen myoklonischen Epilepsie hat sich als eigenständiges Krankheitsbild erst spät etabliert und bis heute nicht einheitlich durchgesetzt. Die Beschreibungen stammen v.a. aus Frankreich, Deutschland und Japan (Aicardi, 1994; Doose et al., 1998, Fujiwara et al., 2003). Es existieren parallel diverse Bezeichnungen, zu denen neben den bereits erwähnten auch der Begriff der „intractable childhood epilepsy with GTC“ – ICEGTC – (Watanabe et al., 1989) und die „polymorphic epilepsy of infants“ (Aicardi, 1994) zählen. In die internationale Klassifikation hat dieses Epilepsiesyndrom bislang keinen Eingang gefunden.

Jungen und Mädchen sind gleich häufig betroffen (Doose et al., 1998). Zu ersten febrilen oder afebrilen generalisierten tonisch-klonischen Anfällen kommt es bei gesunden Kindern im ersten bis fünften, überwiegend im zweiten Lebensjahr. Diese Form der Anfälle bleibt dauerhaft führend. Sie dauern oft lange und zeigen eine inkonstante Seitenbetonung, weshalb von alternierendem Hemi-Grand mal gesprochen wird. Postiktale (Hemi)paresen findet man mit einer Häufigkeit von 25 %. Eine Verschlechterung der Anfallssituation während fieberhafter Infekte ist häufig. Oft wird das klinische Bild durch besonders in Zeiten hoher Anfallshäufigkeit auftretende polytope Myoklonien erweitert.

Es gibt eine Untergruppe von Kindern, bei denen die Erkrankung bereits im ersten Lebensjahr auftritt und einen ungünstigen Verlauf nimmt. Doose und Mitarbeiter (1998) bezeichnen diese Epilepsieform als schwere frühkindliche idiopathische Grand mal-Epilepsie. Die motorische und mentale Entwicklung der Kinder ist meist deutlich beeinträchtigt, in ungefähr 66 % resultiert eine schwere Mehrfachbehinderung. Bei Einsetzen der Anfälle jenseits des ersten Lebensjahres scheint die Prognose besser zu sein (Doose et al., 1998).

Vergleich der Unterformen

Aufgrund der Gemeinsamkeiten der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien wird diskutiert, inwieweit es sich hier um getrennte Syndrome oder eher ein Kontinuum einer Erkrankung handelt. Es ist daher wichtig, sowohl die differenzialdiagnostischen Kriterien herauszustellen als auch die modifizierenden Faktoren zu erkennen, die der polygen determinierten Epilepsie das weit reichende phänotypische Spektrum verleihen.

Um eine myoklonische Epilepsie eines Kleinkindes einem der in Frage kommenden Syndrome zuzuordnen, sind die dominierende Anfallsmorphologie, der EEG-Befund und der Verlauf von wegweisender Bedeutung. Treten ganz überwiegend typische myoklonisch-astatische Anfälle auf, steht die Diagnose einer MAE sicher fest, während eine ausgeprägte Temperatursensibilität eher für die beiden anderen Unterformen typisch ist. Dominieren hingegen GTCS mit wechselnder Lateralisation, diagnostiziert man eine FKGM. Schwieriger wird es aber, wenn Myoklonien einen großen Anteil der Symptomatik ausmachen oder ein sehr buntes Anfallsspektrum beobachtet wird. Myoklonien im Rahmen einer FKGM korrelieren meist mit polymorphen langsamen Wellen mit aufgelagerten hochfrequenten spikes und sharp waves, während myoklonische Anfälle einer SMEI mit besonders irregulären spikes and waves einhergehen. Für eine SMEI ist ebenfalls der Nachweis von fokalen Veränderungen mit wechselnder Lokalisation – Pseudofoci – richtungsweisend, die bei den anderen Formen sehr selten beobachtet werden. Zur Diagnose einer SMEI in Abgrenzung zur MAE ziehen Oguni und Mitarbeiter (2002) daneben die Manifestation im ersten Lebensjahr – nur in etwa einem Viertel beginnt die MAE so früh – und die Häufung febriler und afebriler, oft auch unilateraler GTCS heran. Ebenso ist das Manifestationsalter ein praktikables Differenzierungskriterium zwischen der SMEI und der FKGM, da letztere eher nach dem ersten Geburtstag auftritt. Gerade die Untergruppe der frühkindlichen schweren idiopathischen Grand mal-Epilepsie, wie Dooze das Syndrom bei bereits im Säuglingsalter erkrankten Kindern nennt, zeigt aber auch hier wenig Differenzen zur SMEI, mit der sie auch den ungünstigen Verlauf teilt. Hier ist eine eindeutige Unterscheidung daher oft schwer; wichtigstes Kriterium ist dann das Fehlen bzw. Auftreten massiver Serien myoklonischer Anfälle (Aicardi, 1994; Dooze, 2002). In Japan existiert daher auch die Bezeichnung der „Borderline SMEI“ für die hier FKGM genannte Epilepsieform (Fukuma et al., 2004). Häufig ist eine sichere Differenzierung auch erst im Verlauf der Erkrankung möglich, wenn das im Säuglings- und frühen Kleinkindalter noch relativ uniforme klini-

sche Bild (Dooze, 1992a) und das EEG-Muster charakteristischer werden oder der Effekt der medikamentösen Therapie mit in die Überlegungen einbezogen werden können.

Einen Überblick über die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien geben Übersicht 1.1 und Tabelle 1.1.

Übersicht 1.1: Gemeinsamkeiten der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien

- Beginn im frühen Kindesalter
- unauffällige neurologische, neurometabolische oder neuroradiologische Befunde zum Zeitpunkt der Erstmanifestation
- generalisierte idiopathische Epilepsie mit (febrilen) GTCS und MA
- häufig Temperatursensibilität in Form von fiebergeordneten Anfällen
- Verschlechterung der weiteren psychomotorischen Entwicklung im Verlauf
- EEG: initial normal; irreguläre spike waves; Photoparoxysmen; Thetarhythmen; 3-Hz-SW
- positive Familienanamnese für Fieberkrämpfe und generalisierte Epilepsien in ca. 30 %
- polygenetische Determination

Tabelle 1.1: Unterschiede zwischen den Unterformen der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien

	MAE	SMEI	FKGM
Manifestation	1. bis 5. LJ (meist > 1. LJ)	3. bis 9. LM	5. bis 15. LM (meist 2. LJ)
Geschlechterverteilung (♂:♀)	2-3:1	2:1	1:1
Anfallstypen	myoklonisch, atonisch, astatisch, Absencen, GTCS, im Spätstadium: tonisch, fokal	GTCS (oft unilateral, lang dauernd), myoklonisch (teils statenhaft), tonisch, fokal	GTCS (febril, afebril, lang dauernd, lateralisiert), interiktale Myoklonien
Prognose	variabel	ungünstig	variabel (ungünstig bei Beginn im 1. LJ)

MAE: myoklonisch-astatische Epilepsie; SMEI: schwere myoklonische Epilepsie; FKGM: frühkindliche Grand mal-Epilepsie mit alternierendem Hemi-Grand mal; GTCS: generalisiert tonisch-klonische Anfälle

Im Anschluss an die Darstellung der klinischen Aspekte sollen im Folgenden die zugrunde liegenden genetischen Mechanismen besprochen werden. Hierzu werden zunächst allgemein für Epilepsien gültige Befunde dargestellt, um dann auf die für diese Arbeit relevanten molekulargenetischen Befunde einzugehen.

1.1.2 Genetik epileptischer Anfälle und Syndrome

Ungefähr die Hälfte aller Epilepsien im Kindesalter sind genetisch bedingt. Hier muss unterschieden werden zwischen Epilepsien im Rahmen einer übergeordneten genetischen Erkrankung wie z.B. der tuberösen Hirnsklerose, bei denen neben anderen neurologischen Symptomen und/oder Störungen anderer Organsysteme fakultativ epileptische Anfälle auftreten – *symptomatische* Epilepsie –, und den *idiopathischen* Epilepsien, bei denen eben neben der Epilepsie keine weiteren Symptome bestehen.

Auf einer anderen Ebene, nämlich im Hinblick auf die Art des zugrunde liegenden genetischen Mechanismus, wird unterschieden zwischen Syndromen, an deren Entstehung nur ein Gen beteiligt ist – *monogen* –, und solchen mit *polygener* Ätiologie. Bisher sind knapp 180 monogen vererbte Syndrome mit sekundären Epilepsien beschrieben. Hierzu zählen v.a. Stoffwechseldefekte und Fehlbildungssyndrome mit zerebraler Beteiligung.

Molekulargenetische Befunde bei idiopathischen Epilepsien

Betrachtet man die Gruppe der idiopathischen Epilepsien, findet man eine *monogene* Ätiologie nur in 1-2 % (Robinson & Gardiner, 2000). Eine Übersicht über die zur Zeit bekannten monogenen Syndrome gibt Tabelle 1.2 – für das für diese Arbeit zentrale Syndrom der generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GFS+) folgt eine spezielle Übersicht in Tabelle 1.3. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit sind hier nur Syndrome mit nachgewiesenem Gendefekt aufgeführt. Ergebnisse, die lediglich auf Kopplungsstudien beruhen, sind daher nicht erwähnt.

Weitaus häufiger hingegen sind die *polygen* determinierten idiopathischen Epilepsien mit multifaktorieller Genese (Tsuboi, 1985, Berkovic et al., 1998, Neubauer & Sander, 2001). Hierunter finden sich sowohl Partialepilepsien wie die Rolando-Epilepsie als auch eine Vielzahl generalisierter Epilepsien (Chang & Lowenstein, 2003). Anfänglich dienten vor allem Familienbeobachtungen und Stammbaumanalysen zur Ermittlung der Erbgänge und der Zusammenhänge zwischen verschiedenen klinischen Syndromen. Erschwerend ist dabei das komplexe Vererbungsmuster mit genetischer Heterogenität und unvollständiger Penetranz (Briellmann et al., 2001; Durner et al., 2001).

Tabelle 1.2: Monogen vererbte Epilepsiesyndrome

Syndrom		Genlocus/ Genprodukt	Autoren
ADNFLE	Typ 1	20q13 CHRNA4	Phillips et al., 1995, 2000, 2001; Steinlein et al., 1995, 1997; Hirose et al., 1999; De Fusco et al., 2000 ; Rzycka et al., 2003
	Typ 2/3	1p21 CHRNA2	De Fusco et al., 2000; Phillips et al., 2001
BFNC	Typ 1	20q13 KCNQ2	Biervert et al., 1998, 1999; Leppert et al., 1989 ; Singh et al., 1998; Lerche et al., 1999; Miraglia del Giudice et al., 2000
		8q24 KCNQ3	Lewis et al., 1993; Charlier et al., 1998; Hirose et al., 2000
BFNIS		2q24 SCN2A	Heron et al., 2002
JME	AD Form	GABRA1	Cossette et al., 2002
		2q22-24 CACNB4	Escayg et al., 2000a
		3q26 CLCN2	Haug et al., 2003
ADPEAF		10q24 LGI1	Kalachikov et al., 2002 ; Hedera et al., 2004
CAE		16p13 CACNA1H	Chen et al., 2003

ADNFLE : autosomal dominante nächtliche Frontallappenanfälle; BFNC: benigne familiäre Neugeborenenanfälle; BFNIS : benign familial neonatal-infantile seizures ; JME: juvenile myoklonische Epilepsie; ADPEAF: autosomal dominante Partialepilepsie mit auditorischen Auren ; CAE : childhood absence epilepsy ; CHRN : Acetylcholinrezeptor ; KCN : Kaliumkanal ; SCN : Natriumkanal ; GABR : GABA_A-Rezeptorgen; CACN : Calciumkanal; CLCN : Chloridkanal ; LGI : leucin-rich-glioma-inactivated

Für diese Arbeit sind gerade die Befunde von Interesse, deren Weiterentwicklung zur Beschäftigung mit den frühkindlichen myoklonischen Epilepsien geführt hat. Am Anfang stehen hier die Fieberkrämpfe.

Genetik der Fieberkrämpfe (FS)

Etwa 3 % aller Menschen erleiden mindestens einen fiebergeordneten epileptischen Anfall, wobei Jungen anderthalb mal so häufig betroffen sind wie Mädchen (Fukuyama et al., 1979).

Betrachtet man die Familien der betroffenen Kinder, so ergeben sich klare Hinweise, die auf eine genetische Komponente in der Ätiopathogenese schließen lassen. Annähernd 50 % der Betroffenen haben Angehörige mit Anfällen in der Anamnese. Das Risiko für Geschwister, ebenfalls Fieberkrämpfe zu erleiden, liegt bei 20 % (Hauser et al., 1996).

Zur Aufklärung des Vererbungsmodus liegen viele Studien an Familienkollektiven und Einzelfällen mit unterschiedlichen Ergebnissen vor, wobei sowohl ein autosomal rezessiver Erbgang (Arima et al., 1960) als auch ein autosomal dominanter mit inkompletter Penetranz (Frantzen et. al., 1970; Marini et al., 2003) postuliert wird. Am wahrscheinlichsten erscheint zur Zeit die Hypothese eines multifaktoriellen Geschehens mit polygener Determination (Fukuyama et al., 1979). Moulard und Mitarbeiter (1999) gehen davon aus, dass in ungefähr 30 % ein autosomal dominanter, in den restlichen ein polygener Erbgang vorliegt. Rich geht auf der Basis seiner komplexen Analyse epidemiologischer Daten von einer Heterogenität der Vererbung von Fieberkrämpfen aus (Rich et al., 1987). In diesem Zusammenhang beschreibt Racacho, dass singulären Fieberkrämpfen eher eine polygene, rezidivierenden Fieberkrämpfen eher eine autosomal dominante Vererbung zugrunde liegt (Racacho et al., 2000). Mittlerweile sind dementsprechend auch verschiedene chromosomale Loci für ursächliche Mutationen bekannt, bislang allerdings ohne sichere Genidentifikation.

Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus (GEFS+)

Der Frage, inwieweit Fieberkrämpfe und andere Formen generalisierter Epilepsien gemeinsame genetische Grundlagen haben, widmet sich eine Arbeit von Scheffer und Berkovic (1997). Hier beschreiben die beiden die Ergebnisse ihrer Analyse einer weit verzweigten Familie mit 2000 (!) Mitgliedern, in der gehäuft Fieberkrämpfe, aber auch weitere Formen epileptischer Syndrome vorkommen. Sie definieren dabei die „Fieberkrämpfe Plus“ – FS+ –, die sich von klassischen Fieberkrämpfen durch ein Persistieren febriler Anfälle über das sechste Lebensjahr hinaus und/oder das Hinzukommen afebriler GTCS unterscheiden. Zur Beschreibung des gesamten Phänomens einer Familie mit gehäuften Fieberkrämpfen und weiteren Formen generalisierter Epilepsien führten sie den Begriff der „Generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus“ – GEFS+ – ein, dessen Spektrum in abnehmender Häufigkeit und zunehmender Schwere von einfachen Fieberkrämpfen über FS+ und FS+ mit Absencen, myoklonischen Anfällen oder atoni-

schen Anfällen, aber auch fokalen Anfällen, bis hin zur MAE reicht. In der Folgezeit wurden viele weitere Großfamilien mit einem GEFS+ identifiziert und analysiert (Singh et al., 1999a). Hier fanden sich in Erweiterung des ursprünglichen klinischen Spektrums weitere Anfallsformen und Epilepsiesyndrome wie die SMEI (Singh et al., 1999b), die kindliche Absence-Epilepsie (Lerche et al., 2001b) oder auch ein Lennox-Gastaut-Syndrom (Singh et al., 2001).

Inzwischen sind für unterschiedliche Familien mit GEFS+ mehrere Mutationen nachgewiesen, die drei Gene für Untereinheiten eines spannungsabhängigen Natriumkanals – SCN1A (Escayg et al., 2000b), SCN2A (Sugawara et al., 2001b), SCN1B (Wallace et al., 1998 und 2001b, Audenaert et al., 2003) – und eines für einen GABA-Rezeptor – GABRG2 (Baulac et al., 2001, Wallace et al., 2001a, Harkin et al., 2002) – betreffen (Tabelle 1.3). Bei 17 % aller untersuchten GEFS+-Familien – und damit am häufigsten – sind Mutationen im SCN1A-Gen (Scheffer & Berkovic, 2003) nachgewiesen.

Tabelle 1.3: Bekannte Genloci für GEFS+

Genlocus	Autoren	Gen	assoziierte Erkrankung
19q13	Wallace et al., 1998, 2002; Audenaert et al., 2003	SCN1B	GEFS+ Typ 1
2q23-24	Baulac et al., 1999; Moulard et al., 1999; Escayg et al., 2000b, 2001; Lopes-Cendes et al., 2000; Abou-Khalil et al., 2001; Sugawara et al., 2001a; Wallace et al., 2001b;	SCN1A	GEFS+ Typ 2
5q32-34	Baulac et al., 2001; Wallace et al., 2001a; Harkin et al., 2002	GABRG2	GEFS+ Typ 3
2q24	Sugawara et al., 2001b	SCN2A	GEFS+ (Einzelfallbericht)
7	Nakayama et al., 2002b	MASS1?	GEFS+ (Einzelfallbericht)

SCN: Natriumkanal; GABR: GABA_A-Rezeptor; GEFS+: generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus; MASS : monogenic audiogenic seizure susceptibility ; das Fragezeichen weist darauf hin, dass der Zusammenhang zwischen MASS-Mutationen und GEFS+ bislang nicht sicher belegt ist

Frühkindliche myoklonische Epilepsien

Bei der molekulargenetischen Erforschung der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien stehen zur Zeit die auch im Zusammenhang mit dem GEFS+-Syndrom relevanten Ionenkanalgene und hier besonders die $\alpha 1$ -Untereinheit des zerebralen spannungsabhängigen Natriumkanals vom Typ SCN1A im Mittelpunkt (Tabelle A5 im Anhang).

SCN1A-Mutationen bei SMEI

Im Jahr 2001 führte eine Arbeitsgruppe um Claes eine Studie durch, die bei sieben nicht verwandten Kindern mit sporadischer SMEI ebenfalls Mutationen im Gen der α -Untereinheit des zerebralen spannungsabhängigen Natriumkanals vom Typ SCN1A nachwies. Grundlage für diese Untersuchung war die Überlegung, dass zum Spektrum des GEFS+ schwere myoklonische Epilepsien des Kindesalters gehören und sowohl diesem Syndrom als auch der SMEI eine ausgeprägte Temperatursensibilität zueigen sind, so dass auch Übereinstimmungen oder Ähnlichkeiten auf genetischer Ebene vermutet werden konnten (Claes et al., 2001). Mittlerweile ist es mehreren Arbeitsgruppen gelungen, weitere Mutationen im SCN1A-Gen bei Patienten mit SMEI in einer Frequenz von 30 – 100 %, im Mittel 60 %, nachzuweisen (Ohmori et al., 2002, Sugawara et al., 2002, Claes et al., 2003, Fujiwara et al., 2003, Fukuma et al., 2004). Dabei handelt es sich mit wenigen Ausnahmen (Gennaro et al., 2003, Nabbout et al., 2003a) um Neumutationen, von denen die meisten bisher nur bei jeweils einem Patienten nachgewiesen werden konnten. Eine Übersicht gibt dazu die Tabelle A5 im Anhang.

SCN1A-Mutationen bei FKGM

Vor kurzem ist es der Arbeitsgruppe um Fujiwara (2003) in einer kleinen Studie mit zehn Personen mit FKGM gelungen, in acht Fällen Mutationen im SCN1A-Gen nachzuweisen.

SCN1A-Mutationen bei MAE

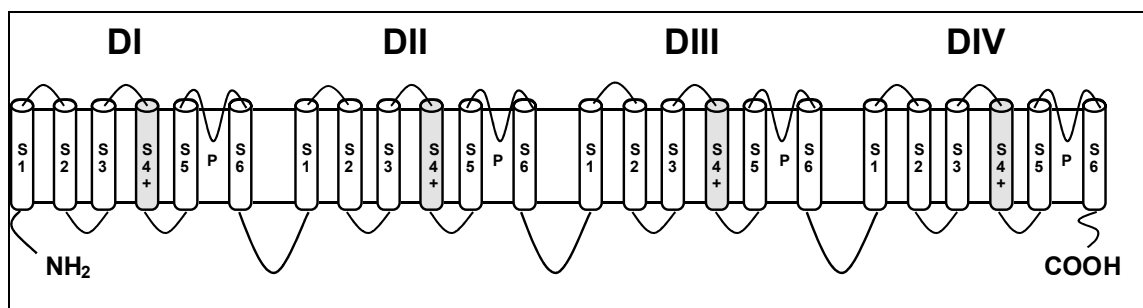
Mutationen bei Patienten mit einer MAE waren zum Zeitpunkt der Planung der vorliegenden Studie nur im Rahmen von GEFS+-Familien gefunden, sporadische Fälle waren zu Beginn des experimentellen Teils dieser Arbeit nicht analysiert worden – zwei Arbeitsgruppen untersuchten in jüngster Zeit kleine Zahlen von Patienten aus dieser Gruppe, konnten aber keine Mutation nachweisen (Ohmori et al., 2002, Nabbout et al., 2003b).

Ebenso wird bei Patienten mit frühkindlichen myoklonischen Epilepsien nach Mutationen in den anderen Kanal- und Rezeptorgenen, die beim GEFS+ eine Rolle spielen (Tabelle 1.3), gesucht. Dort konnten Mutationen bislang – mit einer aktuell publizierten Ausnahme einer SCN2A-Mutation bei einem Patienten mit einer nicht temperatursensiblen, ansonsten aber für eine SMEI klinisch typischen Epilepsie (Kamiya et al., 2004) – nur innerhalb von GEFS+-Familien nachgewiesen werden (Tabelle A4 im Anhang).

1.2 Spannungsabhängiger Natriumkanal (SCN)

Dieser Kanal besteht aus zwei Untereinheiten. Die Untereinheit α ist mit 230-270 kDa die größere der beiden. Sie wird auch als $\text{Na}_v1.1$ bezeichnet. $\text{Na}_v1.1$ ist alleine funktionsfähig und kommt in elf Subtypen vor, von denen im ZNS die Formen SCN1A, SCN2A – vor allem im Neokortex im Großhirn –, SCN3A, SCN5A – im limbischen System –, SCN6A – gliaspezifisch im Neokortex des Großhirns – und SCN8A zu finden sind, im Herzmuskel SCN5A und im Skelettmuskel SCN4A (Alekov et al., 2000). Allen Unterformen ist der für membranständige Ionenkanäle typische Aufbau aus mehreren Domänen und Segmenten gemeinsam (Kullmann, 2002). Sie bestehen aus vier Domänen – bezeichnet mit römischen Ziffern I-IV – mit jeweils sechs Transmembransegmenten – bezeichnet mit S1-S6 – (Abbildung 1.1). Die Kanalpore wird durch die Schleife zwischen S5 und S6 gebildet, im Segment S4 findet sich der Sensor für die Membranspannung. Das Gen für die Isoformen der α -Untereinheit befindet sich auf dem Chromosom 2 im Bereich 2q21-33 jeweils als Einheit für die Gesamtheit der vier Domänen. Die Sequenz ist hochkonserviert mit einer Übereinstimmung von z.B. 98 % zur Ratte.

Abbildung 1.1: Schematischer Überblick über den Aufbau der $\alpha1$ -Untereinheit des Natriumkanals SCN1A



Diese Grafik zeigt schematisch den Aufbau der $\alpha1$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals. Die Transmembransegmente sind mit S1-S6 bezeichnet, die ionendurchlässige Pore mit P. Das + kennzeichnet die Position des Spannungssensors. DI-DIV stehen für die Domänen des Kanals.

Die Untereinheit β ist mit 33-38 kDa deutlich kleiner. Die Gene ihrer drei Subtypen, die alle im ZNS vorkommen – Typ 1 und 2 auch im Herz- und Skelettmuskel –, liegen auf Chromosom 19. Funktionell wird diesem Kanalanteil, der einfach oder doppelt an die α -Untereinheit angelagert ist, vor allem Einfluss auf die Kinetik und Spannungsabhängigkeit des Gesamtkanals zugesprochen (Goldin et al., 2000).

1.2.1 Physiologie und Pathophysiologie der $\alpha 1$ -Untereinheit des zentral exprimierten Natriumkanals SCN1A

Zur Physiologie des Kanals liegen umfassende Untersuchungen vor. Infolge einer Membrandepolarisation kommt es zur Kanalöffnung und damit zum Einstrom von Natriumionen, auf die – ausgelöst durch den schnellen Einstrom – die Inaktivierung folgt. Der Ionenstrom sistiert nach wenigen Millisekunden spontan, und anschließend kehrt der Kanal in seinen aktivierbaren geschlossenen Zustand zurück (Alekov et al., 2000, Köhling, 2002). Zur maximalen Aktivierung des schnellen aktivierenden und inaktivierenden Natriumeinstroms kommt es bei einem Membranpotential von -10 mV (Lossin et al., 2002). Der anschließenden Erholung von der Inaktivierung liegen zwei Komponenten zugrunde, eine dominante schnelle und eine untergeordnete langsame.

Einige der bisher im Gen dieses Kanals gefundenen Mutationen sind bis zu ihrer Wirkung auf die Funktion in vitro aufgeklärt. Dabei sind bei der Vielzahl der Mutationen erwartungsgemäß unterschiedliche Stellen des Kanals betroffen und ebenso verschiedene elektrophysiologische Veränderungen zu beobachten. Störungen der schnellen Inaktivierung durch eine Zunahme des Natriumeinstromes, wie sie von der periodischen hyperkaliämischen Paralyse, einigen Myotonien und dem Long-QT-Syndrom bekannt sind (Alekov et al., 2001), eine Veränderung der Spannungssensitivität durch Mutationen im Bereich des Spannungssensors, eine Zunahme der langsamen Komponente der Erholung von der Inaktivierung oder auch eine Beschleunigung der Aktivierung werden berichtet (Lerche et al., 2001a; Lossin et al., 2003; Noebels, 2003). Daneben werden weitere Beeinflussungen der Kanalfunktion durch einen veränderten Auf- und Abbau des Proteins oder quantitative Defizite im Sinne einer Haploinsuffizienz hypothetisch betrachtet. Handelt es sich um Mutationen, die zu einem verfrühten Stopp-Codon und damit zur Bildung eines trunkierten Proteins führen, werden auch negative Einflüsse der fehlgebauten Anteile auf die Funktion der intakten im Sinne einer negativen Dominanz diskutiert, wenn diese nicht sofort abgebaut oder gar nicht erst produziert werden (Claes et al., 2001, Meisler et al., 2001).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Fragestellung, inwieweit Mutationen im Gen des zentral exprimierten spannungsabhängigen Natriumkanals SCN1A auch in der Ätiopathogenese der sporadischen myoklonischen Epilepsie und der frühkindlichen Grand mal-Epilepsie von Bedeutung sind. Anschließend daran stellte sich uns ebenso die Frage, welche klinischen Charakteristika im Einzelfall eine molekulargenetische Diagnostik in diesen Genen sinnvoll erscheinen lassen. Hierbei soll dem Auftreten oder Fehlen myoklonisch-astatischer Anfälle besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Da bei den GEFS+ und der SMEI die α -Untereinheit SCN1A weitaus am häufigsten betroffen ist, wurde dieses Gen auch in unserer Arbeitsgruppe zuerst untersucht.

Zu diesem Zweck wurden die 26 Exons des entsprechenden Gens sequenziert. In der 50 Personen umfassenden Studiengruppe bildeten Patientinnen und Patienten mit MAE und FKGM den Hauptanteil, es wurden aber auch einzelne Kinder mit SMEI oder noch nicht endgültig klassifizierbarer frühkindlicher myoklonischer Epilepsie eingeschlossen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Zubehör

ABI PRISM [®] 3100; Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Bioprint	Mitsubishi, Tokio
Icematic F100 Compact	Icematic, Norwich
Gefrierschrank –20 °C	Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank –70 °C	Heraeus, Hanau
GeneAmp [®] PCR System 2400	Perkin Elmer, Branchburg
Horizon [®] 58 Gelkammer	Gibco BRC, Eggenstein
Intercept [™] Q-Anion Exchanger	Millipore, Eschleben
Kulturröhrchen	Schott, Mainz
MicroAmp [®] optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt
Micro-Caps	Advanced Biotechnologies, Hamburg
Mixomat	Eppendorf, Hamburg
Multichannel-Pipetten: 10 µl; 100 µl; 300 µl	Eppendorf, Hamburg
Multichannel-Pipettenspitzen: 10 µl; 200 µl	Eppendorf, Hamburg
MultiScreen Vakuum Filtrationssystem	Millipore, Eschleben
MultiScreen-HV Clear Plates	Millipore, Eschleben
Netzgerät	Biometra, Göttingen
PCR 96 Cleanup Plates	Millipore, Eschleben
Pipetten: P10; P20; P200; P1000	Gilson, Villier le Bel
Pipettenspitzen: gelb; blau; kristall; weiß	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße: 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Thermofast [®] 24 PCR Plate	Advanced Biotechnologies, Hamburg
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg

Ultrospec 3000 pro UV/Visible Spectrophotometer	amersham pharmacia biotech, Freiburg
UV-Kamera-System	Mitsubishi, Tokio
Waagen: PM 400; Lab Style 5001	Mettler, Columbus
Wasserbad	Köttermann Laborgeräte, Medingen
Wippschüttler	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen: Biofuge A; 13 R; Sorvall® Multifuge 3	Heraeus, Hanau
Zentrifugenröhrchen: 15 ml; 50 ml	Falcon, Heidelberg

2.1.2 Chemikalien

ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Ampicillin	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
DNA Größenstandards: 100 bp ladder; 1kbp ladder	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP 2,5 µM	Invitrogen, Karlsruhe
One Shot® Chemically Competent E. coli, ampicillinresistent	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Klinikumsapotheke, Gießen
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Genagarose	inno-train Diagnostik GmbH, Kronberg
Glycerol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumacetat pH 5	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe

Oligonukleotide	Roth, Karlsruhe; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PCR-Puffer 10x	Qiagen, Hilden
Phenol	Merck, Darmstadt
POP6 [®] -Matrix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Proteinase K	Boehringer, Ingelheim
Q-Solution 5x	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzym Dde I	New England BioLabs Inc., Frankfurt
D-(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sephadex G-50 Superfine	Amersham Biosciences, Freiburg
SOC medium	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
TOPO [®] -Cloning-reaction-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Trizma-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris pH 8 (Trishydroxymethylaminoethan)	USB, Braunschweig
Triton X	Bio-Rad Laboratories, Hercules
Trypton	Gibco BRC, Eggenstein
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactosid) in Dimethylformamid (40 mg/ml)	Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Yeast Extract	Gibco BRC, Eggenstein

2.1.3 Lösungen

Agarosegel-Auftragspuffer:

30 ml Glycerol
0,05 mg Bromphenolblau
ad 100 ml H₂O

DNA-Extraktionspuffer:

40 ml 1 M Tris pH 8,0
40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
20 ml 5 M NaCl
ad 1.000 ml H₂O
(steril filtriert)

Kern-Extraktionspuffer:

109,5 g Saccharose
5 ml 1 M MgCl₂
10 ml Triton X-100
10 ml 1 M Tris pH 8,0
ad 1.000 ml H₂O
(steril filtriert)

Tris-EDTA:

50 mM Tris pH 8
10 mM EDTA

TBE (5x):

544,9 g Tris-Base
287,1 g Borsäure
46,5 g EDTA
ad 10 l H₂O

Nährmedium für Bakterien (2 YT-Medium):

10 g Yeast Extract
16 g Trypton
5 g NaCl
1 l H₂O
+ Ampicillin (50 µg/ml)

2.1.4 Software zur Sequenzanalyse

SequenceAnalysis 3.7	Applied Biosystems, Weiterstadt
SeqScape	Applied Biosystems, Weiterstadt
dnastar	DNA Star Inc., Madison
ncbi-Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
splice site prediction	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html (Reese et al., 1997) http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/ (Hebsgaard et al., 1996)

2.1.5 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen (Genbankverweise)

DNA	AC010127
mRNA	AB093548
Aminosäuren	P35498

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Als Ausgangsmaterial standen mit EDTA versetzte Vollblutproben der Betroffenen und, soweit möglich, ihrer Eltern sowie einer Kontrollperson zur Verfügung. Diese waren teilweise in Gießen oder in auswärtigen Kliniken frisch gewonnen, teilweise bereits zuvor bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und gelagert worden.

Zur Extraktion der genomischen DNA wählten wir die Phenol-Chloroform-Methode, um eine möglichst hohe Ausbeute zu garantieren. Dabei wird die Ausgangsprobe zunächst mit 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgefüllt (Die genauen Mengen- und Zeitangaben sowie Konzentrationen sind in Übersicht 2.1 aufgeführt). Zur Trennung der korpuskula-

ren Bestandteile vom Plasma folgt eine Zentrifugation. Anschließend wird der Überstand abpipettiert und verworfen. Die verbleibenden Zellen werden zur Lyse und Freigabe der Kerne mit hyperosmolarem Kern-Extraktionspuffer versetzt. Nach kräftigem Mischen und Lagern der Proben auf Eis (Ablauf der Lyse bei gleichzeitiger Hemmung eventueller unerwünschter enzymatischer Prozesse) folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt. Anschließend wird erneut der Überstand verworfen. Zur Freilegung der DNA aus den so verbliebenen Zellkernen werden nacheinander der DNA-Extraktionspuffer, ein DNA-Extraktionspuffer-SDS-Gemisch und Protease K zugegeben und die Proben im Wasserbad inkubiert.

Die folgenden Schritte dienen der Reinigung der gewonnenen DNA – in erster Linie von Proteinen. Wir begannen mit einem Waschgang mit Phenol, das die lipophilen Bestandteile löst und mit diesen eine Phase bildet, die sich unter der wässrigen und damit DNA-haltigen Phase absetzt. Die durch das Phenol denaturierten amphipathischen Proteine bilden eine Interphase. Als Nächstes wird die wässrige Oberphase in Phenol/Chloroform gegeben und Wippschüttlung und Zentrifugation werden wiederholt. In einem dritten Schritt wird erneut die DNA-haltige Oberphase abgenommen und in Chloroform gegeben. Ziel der Verwendung des Chloroforms ist die Entfernung verbliebener Phenolreste, die ansonsten oxidativ wirken könnten.

Nach Abschluss dieser Reinigungsschritte muss die DNA gefällt werden. Dazu wird die am Ende des Chloroformschrittes abgenommene wässrige Phase mit einer Ausfällung aus Natriumacetat und Ethanol versetzt, wodurch die DNA durch Zerstörung ihrer Hydrathülle wasserunlöslich wird. Nach kurzem manuellen Wippen kommt es daher zum sichtbaren Ausfall der DNA, der während einer Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ weiterläuft. Daran schließt sich ein erneutes Zentrifugieren zur Pelletierung des DNA-Präzipitats an. Zur Entfernung der Natriumacetatreste (die ansonsten die weiteren Reaktionen, für die die DNA gewonnen wurde, beeinträchtigen würden) folgt ein Waschgang mit 70 %igem Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation wird das gereinigte Pellet in Tris-EDTA aufgenommen. Die darin enthaltene Trizma-Base dient der Stabilisierung des pH-Wertes im leicht alkalischen Bereich, um eine säurebedingte DNA-Degradation zu verhindern. Der Chelatbildner EDTA bewirkt durch Komplexierung von Kationen die Inaktivierung eventuell noch zurück gebliebener Enzyme.

Übersicht 2.1: DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

- 1.) ca. 5 – 7,5 ml möglichst nicht tiefgefrorenes EDTA-Blut auf 40 ml mit 0,9%iger NaCl-Lösung auffüllen
- 2.) 10 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugieren
- 3.) Überstand verwerfen und verbleibende Zellen in 30 ml Kern-Extraktionspuffer geben
- 4.) 3 x 10 s vortexen
- 5.) 30 min auf Eis lagern
- 6.) 10 min bei 2.500 rpm und 4 °C zentrifugieren
- 7.) Überstand abnehmen (kann in diesem Stadium bei –80 °C gelagert werden) und in 500 µl DNA-Extraktionspuffer geben
- 8.) 500 µl DNA-Extraktionspuffer /SDS 1 % zugeben
- 9.) 1 Spatelspitze Protease K zugeben
- 10.) 3 h bei 50 °C im Wasserbad lagern
- 11.) 1000 µl Phenol zugeben
- 12.) 30 min wippen
- 13.) 10 min bei 2500 rpm und 4 °C zentrifugieren
- 14.) Überstand abnehmen und in 500 µl Phenol geben
- 15.) 20 min wippen
- 16.) 10 min bei ca. 13000 rpm zentrifugieren
- 17.) Überstand abnehmen und in 500 µl Phenol/Chloroform geben
- 18.) 20 min wippen
- 19.) 10 min bei ca. 13000 rpm zentrifugieren
- 20.) Überstand abnehmen und in 500 µl Chloroform geben
- 21.) 20 min wippen
- 22.) 10 min bei ca. 13000 rpm zentrifugieren
- 23.) Überstand abnehmen und in 1000 µl 3 M NaAc pH 5 + Ethanol 100 % (1 + 19) geben
- 24.) manuell wippen
- 25.) über Nacht (oder mindestens 30 min) bei –20 °C lagern
- 26.) 20 min bei ca. 13000 rpm zentrifugieren
- 27.) Überstand verwerfen
- 28.) 200 µl Ethanol 70 % zugeben
- 29.) 10 min bei ca. 13000 rpm zentrifugieren
- 30.) Überstand verwerfen
- 31.) Pellet antrocknen
- 32.) Pellet in 300 µl Tris-EDTA aufnehmen
- 33.) über Nacht (oder wenigstens 8 h) bei 50 °C im Wasserbad lagern
- 34.) auf Dauer bei 4°C lagern

2.2.2 Bestimmung und Einstellung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde photometrisch bestimmt. Dieser Messung liegt die im Lambert-Beer'schen Gesetz formulierte Abhängigkeit der Absorption von Lichtwellen von der Konzentration der durchleuchteten DNA zugrunde:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Die Messung wird bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, die Dicke der Küvette beträgt 1 cm. Unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten für doppelsträngige DNA - $\varepsilon(\text{dsDNA}) = 0,02 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ - ergibt sich ein Faktor von 50 zur Beschreibung der Abhängigkeit der DNA-Konzentration von der Absorption. Zusätzlich wird die Reinheit der DNA durch eine weitere Absorptionsmessung bei 280 nm überprüft, wobei ein Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der bei 280 nm von 1,8 eine nahezu vollständige Proteinfreiheit der Probe charakterisiert. Das zugrunde liegende Messergebnis wird durch die in das Gerät integrierte Software direkt ausgewertet, so dass die endgültige Angabe bereits die Konzentration der DNA in der Einheit $\mu\text{g/ml}$ darstellt. Hierzu ist es notwendig, das Ausgangsmaterial mit H_2O um den Faktor 100 zu verdünnen und jeweils 100 μl der zu messenden Probe einzufüllen, nachdem zuvor die Eichung mit H_2O durchgeführt worden ist.

Anschließend wird die jeweils benötigte Arbeitskonzentration der DNA durch Verdünnung mit H_2O hergestellt.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bereits im Jahr 1971 wurde durch Kleppe und seine Mitarbeiter die theoretische Basis zur Entwicklung der heute aus der molekularbiologischen Forschung und Diagnostik nicht mehr weg zu denkenden PCR gelegt (Kleppe et al., 1971). Mullis und Mitarbeiter waren es dann in der ersten Hälfte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts, die die bis heute nur in Details weiterentwickelte Technik einführten (Mullis et al., 1986).

Unabhängig von der speziellen Anwendung dieses Verfahrens dient es zur Amplifizierung eines definierten Fragments einer Ausgangs-DNA. Dabei wird diese analog der Synthese im lebenden Organismus nach dem Prinzip der Verlängerung eines vorbestehenden Nukleotidstranges unter Mitwirkung einer Polymerase durch Anbau weiterer

Nukleotide vervielfältigt. Es wird dabei ein dreiteiliger Prozess zyklisch durchlaufen, der jeweils mit der Trennung der doppelsträngigen DNA beginnt, indem die Probe auf eine Temperatur von 94 °C aufgeheizt wird – *Denaturierung*. Anschließend folgt eine Abkühlung auf eine Temperatur, bei der es nahezu ausschließlich zur Anlagerung besonders gut passender Gegenstrangabschnitte kommt – *Annealing* –, die dann im dritten Schritt bei einer dem Optimum der Polymerase entsprechenden Temperatur verlängert werden – *Elongation*. Im Annealingschritt wird dabei die entscheidende Grundlage für die Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments gelegt, indem es zu Anlagerungen von der Probe zugesetzten Oligonukleotiden – sog. *Primer* – an passenden Stellen kommt. Diese *Primer* werden immer paarweise so gewählt, dass sie das interessierende Fragment in der Form flankieren, dass der eine einem DNA-Abschnitt kurz vor Beginn des Fragments im 5'→3'-Strang – (Hin)strang –, der andere einem Abschnitt hinter dessen Ende im 3'→5'-Strang – Gegen- oder Rückstrang – entspricht. So wird während der folgenden Elongation der Primer in 3'-Richtung und damit in Richtung des Zielproduktes verlängert. Im nächsten Zyklus, der sich an die Elongation anschließt und wieder mit dem Denaturierungsschritt beginnt, stehen also neben den ursprünglichen DNA-Strängen auch solche, die am 5'-Ende durch den Primer definiert sind, zur Verfügung. Es kann damit jetzt zu einer Aneinanderlagerung eines solchen Stranges mit dem jeweils entgegengesetzten Primer kommen, woraufhin dann am Ende der Elongation das an beiden Enden primerdefinierte Zielprodukt entsteht. In den folgenden Zyklen wird die Anzahl dieses Produktes jeweils verdoppelt, so dass aus 30 Zyklen 2^{28} Exemplare hervorgehen.

Entscheidend für die Automatisierung des Prozesses war die Entdeckung der Polymerase in heißen Quellen lebender thermophiler Bakterien, deren Temperaturoptimum um 70 °C und damit zwischen der Denaturierungs- und der Annealingtemperatur liegt, die aber auch die Phase der Erwärmung auf 94 °C übersteht, so dass sie nicht in jedem Zyklus erneut zugefügt werden muss.

Aus den beschriebenen Grundlagen der ablaufenden Reaktion geht hervor, dass der Erfolg grundlegend von der Bindung der Primer an die Zielregion abhängig ist. Hierbei spielt sowohl die Wahl der Oligonukleotide selbst als auch die der genauen Reaktionsbedingungen eine entscheidende Rolle. Die Oligonukleotide sollten die in der folgenden Übersicht (Übersicht 2.2) aufgeführten Kriterien so weit wie möglich erfüllen.

Übersicht 2.2: Kriterien für das Design von Oligonukleotide

- Sequenz von ca. 15-25 Basen mit ausreichendem Abstand zum Beginn der Zielregion
- Vorkommen aller 4 Basen in möglichst ähnlicher Anzahl
- keine Bildung von Sekundärstrukturen
- keine Bindung an anderen Stellen der DNA
- keine Komplementarität untereinander
- nahe beieinander liegende Dissoziations- oder Schmelztemperatur

2.2.3.1 Amplifikation des SCN1A-Gens

Wir übernahmen zur Amplifikation der 26 Exons des SCN1A-Gens mit kleinen Veränderungen die von Claes und Mitarbeitern veröffentlichten Oligonukleotidsequenzen (Claes et al., 2001) und etablierten die Bedingungen an einer Kontroll-DNA-Probe. Die Bezeichnung der Primer setzt sich aus der Nummer des Exons und einem Buchstaben zur Angabe der Ausrichtung – f = forward = Hinstrang; r = reverse = Gegenstrang – zusammen. Falls es im Verlauf der Arbeit notwendig war, zum Erhalt sicher zu analysierender Sequenzen zusätzliche Primer einzusetzen, wurden diese mit einer Ziffer am Ende versehen – 2 = 2. Primer für dieses Exon und diese Richtung. Bei der Bearbeitung des extrem langen Exons 26 war es nötig, dieses in mehreren Abschnitten unter Nutzung mehrerer Primerpaare zu amplifizieren, wobei wir für die Amplifikation im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um Claes mit zwei statt drei Fragmenten arbeiteten – Exon 26a und Exon 26bc. Wir führten die Definition der Bedingungen mit jeweils drei Ansätzen pro Exon durch (Übersicht 2.3). Das Ergebnis ist in tabellarischer Form im Anhang zu finden (Tabelle A3). Gleiches gilt für die eingesetzten Primer mit ihrer Sequenz und Schmelztemperatur (Tabelle A1). Der Erfolg der PCR wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft (Abschnitt 2.2.4).

Übersicht 2.3: PCR-Ansätze

Zur Etablierung der Reaktionsbedingungen

- 2,00 µl PCR-Puffer 10x
- 2,00 µl dNTP 2,5 mM
- 1,00 µl Primer f 20 µM
- 1,00 µl Primer r 20 µM
- 1,00 µl template-DNA 10 ng/µl
- 0,25 µl Taq-Polymerase
- 4,00 µl Q-Solution oder 1,6 µl MgCl₂ oder kein weiterer Zusatz
- ad 20,00 µl H₂O

Für die Diagnostik

- 5,00 µl PCR-Puffer 10x
- 5,00 µl dNTP 2,5 mM
- 2,50 µl Primer f 20 µM
- 2,50 µl Primer r 20 µM
- 10,00 µl template-DNA 10 ng/µl
- 0,25 µl Taq-Polymerase
- ggf. 4,00 µl MgCl₂
- ad 50,00 µl H₂O

2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA

Ein übliches Verfahren zur Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten ist die Gelelektrophorese. Wir wählten ein 1,0-1,1 %iges Agarosegel, da sich diese Konzentration als geeignet für die Größe der zu bearbeitenden DNA-Moleküle zwischen 250 und 1000 bp erwiesen hat. Die angelegte Spannungen betrug 85-125 V in Abhängigkeit von der Größe des Gels. Die Gelkammer wird mit dem Laufpuffer 1x-TBE als Elektrolyt aufgefüllt. Dieser wird ebenso zum Lösen der Gelagarose genutzt. Den aufzutrennenden DNA-Proben – es wurden je 0,5 µg (= 5 µl) des PCR-Produktes auf das Gel aufgetragen – setzten wir einen dem Einfüllen der Proben in die Gelkammern und der Visualisierung der Probenbewegung im Gel dienenden Auftragspuffer zu. Zusätzlich zu den Proben ließen wir auf jedem Gel einen Größenstandard mitlaufen. Zur optischen Analyse des Ergebnisses wurde das Gel anschließend in Ethidiumbromid (0,01 % in TBE) gefärbt, welches sich aufgrund seiner aromatischen Struktur zwischen den Ba-

sen der Nukleotide anlagert, und mittels einer UV-Lichtquelle beleuchtet, worunter der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex orangefarbig fluoresziert – $\lambda = 500\text{-}590\text{ nm}$. Zur Dokumentation wurde ein Foto angefertigt.

2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der mit Hilfe der PCR amplifizierten DNA-Fragmente dient der Ermittlung der Basenabfolge, um diese dann mit der bekannten Referenz-/Wildtypsequenz vergleichen und so Mutationen aufdecken zu können. Das Grundprinzip der meisten Methoden liegt in einer Markierung des jeweiligen Primers – da zur Sequenzierung einzelsträngige DNA benötigt wird, werden Strang und Gegenstrang getrennt bearbeitet – und der Zugabe von Didesoxynukleotiden (ddNTP), denen die Hydroxylgruppe an der Desoxyribose fehlt und deren Einbau daher zu einem Abbruch der Elongation während einer der PCR analogen Sequenzierungsreaktion führt – Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Es entsteht dadurch eine Mischung von Fragmenten, die jeweils nach unterschiedlich weit fortgeschrittener Elongation enden, so dass jede Länge bis hin zum Gesamtfragment vertreten ist. In einem weiteren Schritt werden diese nun längenabhängig getrennt und können der Reihe nach aufgrund der Markierung in eine Basensequenz übersetzt werden. Wir nutzten ein System der Firma Applied Biosystems (ABI PRISM[®] 3100, Genetic Analyzer), das fluoreszenzmarkierte Fragmente kapillarelektrophoretisch über eine spezielle Polymermatrix (POP6[®]) auftrennt und die Sequenz automatisch abliest und bearbeitet. Ein Vorteil dieses Gerätes liegt in der Möglichkeit, anstelle der markierten Oligonukleotide fluoreszenzmarkierte ddNTPs einzusetzen, die entsprechend ihrer jeweiligen Base ein spezifisches Signal aussenden, welches der Detektor unterscheiden kann, so dass es nicht mehr notwendig ist, für jede einen eigenen Ansatz zu bearbeiten.

Zur Aufreinigung der Proben entschieden wir uns für ein Filterverfahren, bei dem die Probe auf eine 96-well-Platte mit einer spezifischen Membran aufgetragen und dann über ein Vakuum durch diese gesaugt wird. Hierbei können die DNA-Fragmente aufgrund ihrer Größe die Membranporen nicht passieren, während Primer, Oligonukleotide und weitere Reste des Reaktionsmixes mit dem Wasser entfernt werden. Für die der PCR analog verlaufenden Sequenzierungsreaktion wird der in Wasser gelösten Probe ein Primer und ein von der Firma hergestellter Reaktionsmix zugesetzt, der neben den

für die Reaktionsbedingungen notwendigen Salzen und Detergenzien sowohl komplette dNTP als auch in um ein Vielfaches geringerer Menge ddNTP und eine modifizierte Polymerase enthält. Reaktionsansatz und –bedingungen konnten wir für alle Exons einheitlich gestalten (Übersicht 2.4).

Übersicht 2.4: Sequenzierreaktion

Reaktionsansatz	Reaktionsbedingungen
10,0 µl Template	1 Zyklus: 96 °C/1‘
1,5 µl Primer 1,6 µmol/l	25 Zyklen: 96 °C/10“
3,0 µl ABI Cycle Sequencing Kit	50 °C/5“
	60 °C/4‘

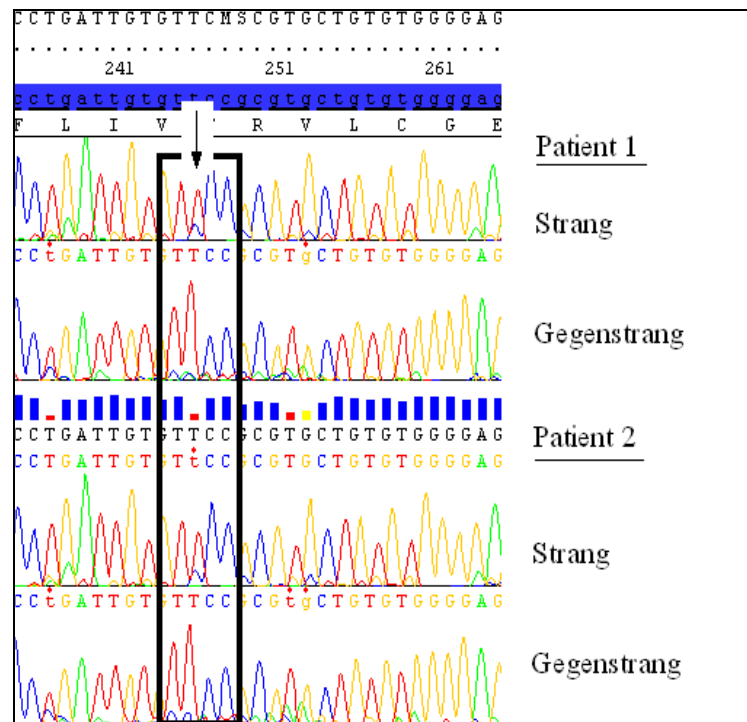
Anschließend folgt erneut eine Aufreinigung, wobei jetzt eine Sephadexmatrix zur Anwendung kommt, in deren Struktur kleine Moleküle festgehalten werden, während die größeren DNA-Fragmente in der folgenden Zentrifugation in wässriger Lösung durchgefiltert werden. Abschließend kommt es nach Einspeisung der zum Schutz vor Verdunstung mit Formamid versetzten Proben in das Gerät zur automatisierten kapillarelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente entsprechend ihrer Länge und zur Detektion der mittels Laser zur Fluoreszenz angeregten ddNTPs am Ende der DNA-Bruchstücke, deren Abfolge dann in einem Elektropherogramm dargestellt wird.

2.2.6 Sequenzanalyse

Zur Auswertung der Sequenzdaten nutzten wir die auf den gewählten Sequencer zugeschnittenen beiden Computerprogramme SequenceAnalysis[®] und SeqScape[®]. Ein großer Vorteil des Programms SeqScape[®] liegt darin, dass es die Möglichkeit bietet, zahlreiche Sequenzen parallel mit der Referenzsequenz und untereinander zu vergleichen. Es können so mehrere Sequenzierungen der DNA einer Person und auch die mehrerer Personen gleichzeitig berücksichtigt werden. Dadurch wird die Sicherheit, auffällige Strukturen als mutationsbedingt einzuordnen, erhöht. Es ist nämlich möglich, nicht eindeutig der Referenz entsprechende Abschnitte als nicht mutiert, sondern als verfahrens- oder strukturebedingt nicht einwandfrei lesbar zu klassifizieren, wenn sie bei mehreren Personen in gleicher Weise auffällig oder in weiteren Sequenzierungen der gleichen Person unauffällig sind (Abbildung 2.1). Ursache für solche Sequenzabweichungen

kann neben technischen Problemen während der Sequenzierung z.B. die Überlagerung einer Base durch eine andere in dieser Region gehäuft vorkommende Base sein.

Abbildung 2.1: Beispiel für die Darstellung des Sequenzierungsergebnisses im Programm SeqScape



In dieser Abbildung ist ein Abschnitt der mit Hilfe des ABI PRISM® 3100; Genetic Analyzer analysierten und mit dem Programm SeqScape bearbeiteten Sequenz wiedergegeben. Der Pfeil weist auf eine Basenposition, an der bei beiden Patienten im Strang neben dem hochamplitudigen roten Signal für die Base T ein kleineres blaues Signal für die Base C zu sehen ist. Sowohl durch Betrachtung der analogen Position im Gegenstrang des gleichen Patienten – hier ist das blaue Signal eindeutig dem Hintergrund zuzuordnen – als auch durch den Vergleich mit einem anderen Patienten – das Auftreten derselben Mutation bei zwei Personen ist unwahrscheinlich – kann eine gut abgesicherte Einordnung des Phänomens erfolgen.

Darüber hinaus ist das Programm in der Lage, die Qualität des Ergebnisses seiner Analyse des Elektropherogramms graphisch und numerisch anzuzeigen.

2.2.7 Klonierung

Fand sich eine das Leseraster verschiebende Mutation, diente eine Klonierung des Produktes der getrennten Sequenzierung beider Allele und damit der exakten Darstellung der Insertion oder Deletion im Vergleich zum Wildtyp.

Dazu wird im Anschluss an die Amplifikation des mutationstragenden DNA-Fragments per PCR dieses in Plasmide eingeschleust, welche – in unserem Fall von der Firma In-

vitrogen – kommerziell hergestellt werden und neben einer Ampicillin-Resistenz das Gen für die Beta-Galaktosidase enthalten. Zusätzlich ist eine Topoisomerase I bereits kovalent gebunden. Gemeinsam mit dem PCR-Produkt und einem Puffer, der die Rate der erfolgreichen Transformationen erhöht (Instruction Manual zu TOPO TA Cloning, Invitrogen, 2003), werden diese Vektoren dann mit E.-coli-Bakterien gemischt. Zur Inkorporation der Plasmide in die Bakterien wird das Gemisch zunächst auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock von etwa 37 °C ausgesetzt. Nach erneuter Inkubation in einem speziellen Nährmedium werden die Bakterien auf Kulturplatten aufgetragen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert, so dass diverse Klone wachsen. Da dem Nährmedium auf diesen Platten Ampicillin zugesetzt ist, können sich nur die vektorhaltigen Bakterien vermehren. Zur Identifizierung derjenigen Klone, bei denen eine erfolgreiche Insertion des DNA-Fragments stattgefunden hat, ist im Medium X-Gal enthalten, ein Molekül mit einem Galaktose- und einem Farbstoffanteil. Dieses wird von der Beta-Galaktosidase so gespalten, dass der blaue Farbstoff freigesetzt wird. Das Enzym wird aber nur in den Bakterien gebildet, in deren Plasmid das entsprechende Gen nicht durch den Einbau des Inserts getrennt und dadurch inaktiviert wurde. Die gesuchten Klone sind also nicht oder nur diskret blau gefärbt und können so gezielt zur anschließenden Sequenzierung ausgewählt werden. Wir trugen dafür zunächst 15 bis 20 dieser Klone sowie einen blauen Klon als Negativkontrolle auf ein Agarosegel auf – die DNA des leeren Plasmids läuft hier aufgrund ihrer geringeren Länge schneller als die der anderen – und wählten anschließend zehn Klone zur weiteren Sequenzanalyse aus.

2.2.8 Restriktionsanalyse

Um die Frequenz eines Basenaustauschs in einer großen Population festzustellen, wandten wir die Methode der Restriktionsanalyse an. Hierzu wird die Spezifität von Restriktionsenzymen, die bestimmte Basensequenzen erkennen und in diesem Bereich die DNA schneiden, genutzt. Wählt man ein Enzym, dessen Erkennungssequenz – *recognition site* – durch die Mutation zerstört wird, dann wird also bei der Wildtypvariante die DNA an dieser Stelle geschnitten und es entstehen zwei Fragmente. Bei der Mutationsvariante fällt die Schnittstelle weg und es resultiert nur ein Fragment. Führt die Mutation zum Entstehen einer Erkennungssequenz, verhält es sich genau umgekehrt.

Der technische Ablauf dieses Verfahrens ist in der folgenden Übersicht 2.5 im Einzelnen beschrieben.

Übersicht 2.5: Restriktionsanalyse

1. 100 µl-PCR-Ansatz des interessierenden Fragments – ergibt ca. 1-2 µg DNA (vgl. 2. 2.3)
2. Zugabe von 250 µl 100 %igem Ethanol
3. Lagerung für mindestens 1 h bei –20 °C
4. Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm
5. Zugabe von 250 µl 70 %igem Ethanol
6. Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm
7. Erneute Zugabe von 250 µl 70 %igem Ethanol
8. Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm
9. Trocknen bei 37 °C
10. Aufnahme des DNA-Pellets in 10 µl Tris-EDTA
11. Zugabe von 2-5 Units des Restriktionsenzym, des Puffers und Auffüllen auf 20 µl mit H₂O
12. Inkubation für mindestens 5 h bei 37 °C
13. Auftragen des gesamten Ansatzes und eines zu den erwarteten Fragmenten passenden Größenstandards auf ein 4 %iges Agarosegel
14. Visualisierung und Dokumentation des Ergebnisses durch Interkalierung von Ethidiumbromid und UV-Beleuchtung

3 Studienpopulation

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden nach üblicher Aufklärung und Einverständniserklärung DNA-Proben von 50 Kindern und Erwachsenen mit unterschiedlichen Formen der frühkindlichen Epilepsien auf Mutationen im SCN1A-Gen untersucht. Die Studienpopulation setzte sich zusammen aus einer Gruppe Erwachsener, die als Kinder im Epilepsie-Zentrum Raisdorf (Kiel) von Professor Doose betreut wurden, einer Gruppe von Kindern mit FKGM, deren DNA im Rahmen einer anderen Studie an der Universitätskinderklinik in Kiel unter der Leitung von Professor Stephani gesammelt wurde, und aus aktuellen Patientinnen und Patienten unserer eigenen Klinik sowie verschiedener anderer neuropädiatrischer Abteilungen und eines niedergelassenen Kinderarztes (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Herkunft der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer

Herkunft der Probe	Zahl
Epilepsiezentrum Raisdorf (Professor Doose)	12
Kieler FKGM-Gruppe	8
<u>Neuropädiatrische Kliniken:</u>	
Mödling (Österreich)	6
Münster	6
eigene Klinik (Gießen)	5
andere Kliniken	11
niedergelassener Kinderarzt	2

3.1 Diagnose und Zuordnung der Epilepsiesyndrome

Bei allen Untersuchten ist von den behandelnden Ärztinnen und Ärzten die Diagnose einer frühkindlichen myoklonischen Epilepsie soweit möglich nach den Kriterien der ILAE gestellt worden. Die definitive Zuordnung zu einer der Unterformen ist nicht immer sicher möglich, da bei einigen Kindern der Krankheitsbeginn noch nicht lange genug zurück liegt und somit der Verlauf noch nicht die spezifischen Kriterien zeigt oder das klinische Bild Charakteristika mehrerer Unterformen aufweist. Die teils schwierige

Diskussion der genauen Klassifikation ist in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich dargestellt. Die Häufigkeit der Epilepsiesyndrome in unserem Kollektiv ist in Tabelle 3.2 angegeben.

Die Gruppe der jetzt erwachsenen ehemaligen Patienten von Professor Doose ist Teil der Kinder, die zur ursprünglichen Definition des Epilepsiesyndroms in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts herangezogen wurden.

3.2 Geschlechterverteilung

Betrachtet man die Geschlechterverteilung, so ergibt sich insgesamt ein leicht mädchenwendiges Verhältnis von 27 weiblichen zu 24 männlichen Personen. In den einzelnen, zum Teil allerdings sehr kleinen Untergruppen finden sich teilweise ähnliche Verhältnisse – in der Gruppe der FKGM liegt mit 10 zu 7 eine leichte Mädchenwendigkeit vor, auch die beiden Kinder mit einer SMEI sind Mädchen –, teilweise aber auch davon abweichende Verhältnisse – in der Gruppe der MAE sind mit 11 zu 10 und in der Gruppe der nicht genauer präzierten frühkindlichen myoklonischen Epilepsien mit 6 zu 4 beide Geschlechter nahezu gleichmäßig vertreten mit minimalem Überwiegen des männlichen Geschlechts (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Verteilung der Epilepsiesyndrome und Geschlechterverteilung

Epilepsiesyndrom	Zahl (Geschlechterverteilung ♀/♂)
MAE	21 (10/11)
SMEI	2 (2/0)
FKGM	17 (10/7)
FME, nicht genauer spezifiziert	10 (4/6)

3.3 Verlauf und Outcome in der Gruppe der myoklonisch-astatischen Epilepsie

Die Personen aus der von Professor Doose betreuten Gruppe sind mittlerweile erwachsen, so dass hier gute Informationen über den langfristigen Verlauf vorliegen. Von den 12 in diese Studie eingeschlossenen Personen sind sieben zur Zeit anfallsfrei und führen

ein unbeeinträchtigtes (Familien)leben, fünf von ihnen nehmen seit langem keine Medikamente mehr ein. Bei den übrigen sechs besteht eine unterschiedlich schwer ausgeprägte Behinderung, die eine Betreuung durch die Eltern oder in einer entsprechenden Institution notwendig macht. Bezüglich der momentanen Anfallssituation und Therapie sind hier nur vereinzelt Details bekannt.

3.4 Betroffene Geschwisterpaare

In vier der von uns untersuchten Familien sind mehrere Kinder an einer Epilepsie erkrankt. Dabei handelt es sich zweimal um Zwillingsschwestern mit einer MAE, von denen je eine im frühen Kindesalter an einem sog. SUDEP (sudden unexpected death of epileptic patient = plötzlicher unerwarteter Tod eines Epilepsiepatienten) verstorben ist – in einem Fall haben wir dennoch von beiden Mädchen eine DNA-Probe. Bei dem dritten Schwesternpaar handelt es sich um ein Mädchen mit einer FKGM und ihre vier Jahre jüngere Schwester, bei der bisher in erster Linie Absencen zu beobachten sind. Das vierte Geschwisterpaar gehört zur Gruppe aus der Betreuung von Professor Doose. Bei der älteren Schwester besteht eine mittlerweile medikamentös komplett in Remission gebrachte MAE, der jüngere Bruder erlitt keine oder nur sehr vereinzelte Anfälle, zeigt aber deutliche Veränderungen im EEG und wird daher ebenfalls behandelt.

3.5 Exemplarische Fallgeschichten

Im Folgenden werden die Krankheitsverläufe der Betroffenen exemplarisch geschildert, bei denen eine Mutation im untersuchten Natriumkanalgen vorliegt.

3.5.1 Patientin 1 (Myoklonisch-astatische Epilepsie)

Es handelt sich um eine der Patientinnen, die in den 1970er Jahren im Epilepsiezentrum Raisdorf von Professor Doose betreut wurde. Sie kam als erstes Kind gesunder Eltern per sekundärer Sectio bei Wehenschwäche zur Welt. In den Familien der Eltern sind keine Epilepsien bekannt. Bei der Mutter wurde jedoch im Verlauf ein pathologisches

EEG mit einer rhythmischen generalisierten Verlangsamung der Grundaktivität abgeleitet. Der erste generalisierte tonisch-klonische Krampfanfall ereignete sich bei der Patientin im Alter von drei Monaten. Weitere GTCS folgten auch nach Einleitung einer antikonvulsiven Therapie. Im Kleinkindalter standen weiterhin die GTCS im Vordergrund, zusätzlich kam es aber zu myoklonisch-astatischen Anfällen und Absenzen. Im Spätstadium traten auch tonische Anfallsmuster auf. Ein vollständiges Sistieren der Anfälle war trotz intensiver pharmakotherapeutischer Bemühungen auch nach Hinzunahme von Bromid nicht zu erreichen. Zunehmend zeigten sich eine geistige Behinderung und eine zerebrale Bewegungsstörung; als Erwachsene lebt sie bei ihren Eltern und arbeitet in einer Werkstatt für Behinderte. Im EEG fanden sich im Alter von acht Monaten erstmalig Veränderungen in Form von generalisierten Thetarhythmen, später ließen sich dann auch kurze Gruppen irregulärer spikes and waves finden. Im Verlauf dominierte eine generalisierte rhythmische und polymorphe Verlangsamung der Grundaktivität ohne Zeichen hypersynchroner Aktivität (EEG-Beispiele in Abbildung 3.1). Die Epilepsie dieser Patientin zeigt sicher gerade durch den frühen Erkrankungsbeginn Überschneidungen mit einer schweren myoklonischen Epilepsie des Kindesalters, wurde aber auf Grund des Anfallsspektrums und relativ günstigen Verlaufs von Doose selbst als myoklonisch-astatische Epilepsie klassifiziert.

Aktuell besteht bei der Patientin eine relativ stabile Anfalls- und Allgemeinsituation. Unter einer Kombinationstherapie kommt es zu ca. vier überwiegend generalisiert tonisch-klonischen Anfällen pro Monat.

rapie gestaltete sich sehr schwierig. Trotz Einsatz zahlreicher Antikonvulsiva in Mono- und Kombinationstherapie konnten immer wieder nur kurze Phasen kompletter Anfallsfreiheit erreicht werden. Unter der aktuellen Kombinationstherapie aus Valproat, Lamotrigin, Clonazepam und Topiramat kommt es bei dem jetzt acht Jahre alten Mädchen vereinzelt zu kurzen GTCS. Zusätzlich besteht bei ihr eine hypoton-ataktische Bewegungsstörung. Auch die geistige Entwicklung ist schwer beeinträchtigt. Wiederholte MRT-Untersuchungen zeigten lediglich eine geringe Kleinhirnhypoplasie. Die Liquordiagnostik mit Bestimmung der Neurotransmitter erbrachte keine auffälligen Befunde. Im EEG zeigte sich der für frühkindliche myoklonische Epilepsien typische Verlauf mit initialer Unauffälligkeit und später auftretenden generalisierten Theta- und Deltarhythmen mit spike wave-Paroxysmen. Aktuell lassen sich neben einer geringen Verlangsamung bei irregulärer Grundaktivität multifokal spike waves und sharp waves finden. Bei der syndromalen Zuordnung der Epilepsie des Kindes stehen differenzialdiagnostisch die schwere myoklonische Epilepsie des Kindesalters und die früh beginnende und schwer verlaufende Form der frühkindlichen Grand mal-Epilepsie zur Diskussion. Letztendlich halten wir die Diagnose einer SMEI für zutreffender.

3.5.3 Patient 3 (Frühkindliche Grand mal-Epilepsie)

Betroffen ist ein zum Zeitpunkt der Untersuchung 5 Jahre alter Junge, der vom 6. Lebensmonat an zunächst unter Fieber prolongierte Anfälle mit wechselnd lateralisierter postiktaler Parese erlitt. Im Verlauf traten dann auch afebrile Anfälle mit tonischer und myoklonischer Morphe teils in statenhafter Häufung auf. In der umfangreichen Diagnostik fanden sich keine Hinweise auf eine Stoffwechselerkrankung; in der Bildgebung fielen unspezifische Veränderungen wie eine Erweiterung der Liquorräume und eine Volumenreduktion im linken Temporallappen auf. Klinisch zeigt der Junge eine deutliche Ataxie und übersteigerte Muskeleigenreflexe, seine Entwicklung, die bis zum Beginn der Anfälle regelrecht verlaufen war, ist deutlich verzögert, wenn auch stetig voranschreitend. Trotz Einsatz vieler Antikonvulsiva konnte bislang keine befriedigende Anfallssituation erreicht werden. Im EEG des Jungen finden sich sowohl über der linken als auch über der rechten Hemisphäre epilepsietypische Potentiale.

Letztendlich klassifizieren wir diese Epilepsie trotz ihrer teils an ein fokales Geschehen erinnernden Aspekte als schwer verlaufende frühkindliche Grand mal-Epilepsie mit alternierendem Hemi-Grand mal.

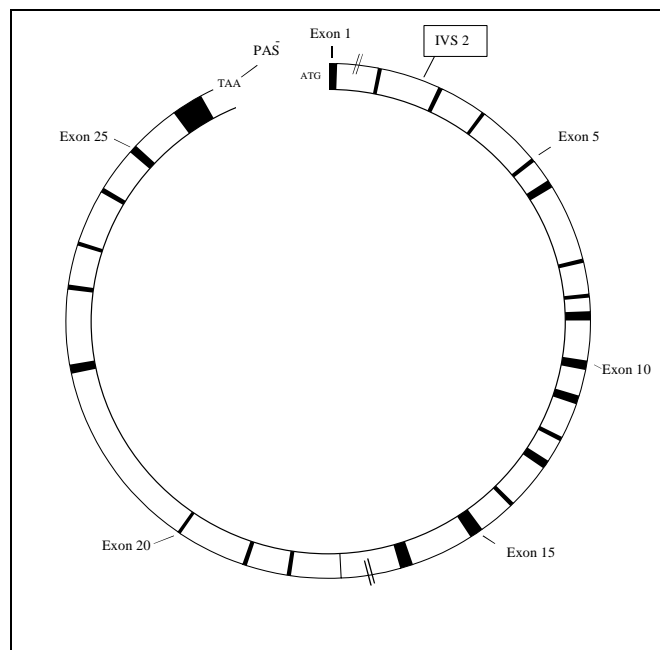
4 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde bei 50 Patientinnen und Patienten mit frühkindlicher myoklonischer Epilepsie das Gen für die $\alpha 1$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals SCN1A auf Mutationen hin untersucht.

Wie die meisten spannungsabhängigen Ionenkanäle besteht der Natriumkanal aus zwei Untereinheiten, deren größere – die $\alpha 1$ -Untereinheit – aus vier Domänen mit je sechs Transmembransegmenten aufgebaut ist (Abbildung 1.1 im Kapitel „Einleitung“). Die Kanalpore wird gemeinsam von den Segmenten 5 und 6 jeder Domäne gebildet, der Spannungssensor liegt in Segment S4. Das Kanalprotein besteht aus 2.009 Aminosäuren und hat eine Größe von 228.970 Da. Der SCN1A-Anteil ist alleine funktionsfähig, wird aber in vivo durch die ihm angelagerten β -Untereinheiten in erster Linie in seiner Kinetik beeinflusst.

Das auf Chromosom 2 an der Stelle 2q24.3 gelegene Gen umspannt eine Länge von 84.478 Basenpaaren. Die Exon-Intron-Abfolge des Gens gibt die folgende Grafik schematisch wieder (Abbildung 4.1).

Abbildung 4.1: Größenmaßstab der Exon-Intron-Abfolge im SCN1A-Gen



In dieser Grafik ist die Abfolge der Exons und Introns der DNA des Natriumkanals SCN1A entsprechend ihrer Länge dargestellt. Die Exons sind durch schwarze, die Introns durch weiße Flächen symbolisiert. Aus Gründen der besseren Darstellbarkeit wurden die sehr langen Introns 1 und 16 um den Faktor 10 verkleinert. PAS = Polyadenylierungssequenz

Nach Extraktion der DNA aus Leukozyten wurden die 26 Exons des Gens mittels PCR amplifiziert – die jeweiligen PCR-Bedingungen sowie die Länge der PCR-Produkte sind in Tabelle A3 im Anhang aufgeführt – und anschließend über ein kapillarelektrophoretisches System sequenziert – ABI PRISM[®] 3100. Als Primer kamen Oligonukleotide mit der von Claes und Mitarbeitern (2001) publizierte Basenabfolge sowie einige ergänzende Oligonukleotide zum Einsatz (Tabelle A1 im Anhang).

Es werden nun die in den einzelnen Exons gefundenen Abweichungen der Sequenz im Vergleich zum Wildtyp unter Berücksichtigung ihrer Konsequenz für die Proteinsynthese dargestellt. Welches Exon in welche Gruppe gehört, zeigt die folgende der detaillierten Beschreibung vorangestellte tabellarische Übersicht (Tabelle 4.1).

Tab 4.1: Übersicht über die Exons mit Abweichung von der Wildtypsequenz

Exon	Abweichung vom Wildtyp	Exon	Abweichung vom Wildtyp
1	keine	14	keine
2	keine	15	Mutation c.2824C>A (R936S)
3	keine	16	Polymorphismus c.3199A>G (T1067A)
4	keine	17	keine
5	keine	18	Mutation IVS18+5G>C
6	keine	19	keine
7	keine	20	keine
8	keine	21	keine
9	Polymorphismus c1212A>G Mutation c.1299insC (L434fsX449)	22	keine
10	Polymorphismus IVS10-60insT	23	keine
11	keine	24	keine
12	keine	25	Polymorphismus c.4731T>C
13	Polymorphismus c.2292C>T	26	Polymorphismus c.5418G>A

4.1 Exons ohne Sequenzabweichung

In den Exons 1-8, 11, 12, 14, 17 und 19-24 fanden sich bei unseren 50 Proben keine Abweichungen der Basensequenz im Vergleich zur Referenzsequenz – als Referenz dient der das gesamte Chromosom 2 umspannende BAC-Klon RP11-2I8; Genbank-Ac-

cession-Nummer AC010127. Zur Beschreibung der Basenpositionen im Gen wird in dieser Arbeit die Nummerierung der DNA des Klons benutzt, der die mRNA des SCN1A-Gens beinhaltet und in der Genbank unter der Accession-Nummer AB093548 zu finden ist. Die Aminosäuren des Kanalproteins sind entsprechend der von Escayg (Escayg et al., 2000b) veröffentlichten Sequenz bezeichnet.

Es soll nun nur das Exon 14 aus dieser Gruppe im Einzelnen betrachtet werden, da für dieses eine Besonderheit in der Oligonukleotidsequenz gilt.

4.1.1 Exon 14

Die Basensequenz des reverse-Primers 14r für dieses Exon weist unserer Meinung nach in der Publikation von Claes und Mitarbeitern einen Fehler in Form einer fehlenden Base auf. Wir verwandten daher einen um diese ergänzten und damit der Sequenz des Gens entsprechenden Primer 14r2. In der folgenden Abbildung sind die beiden Varianten einander gegenüber gestellt (Abbildung 4.2).

Abbildung 4.2: Vergleich der Sequenz des als Primer für die Amplifikation von Exon 14 verwandten Oligonukleotids nach Claes (2001) und in unserer Version.

Ursprüngliche Sequenz nach Claes:

GCT ATG CA—G AAC CCT GAT TG

GCT ATG CAA GAACCTGA TTG

Von uns verwandte Sequenz analog zur verwandten Referenz-mRNA (AB093548)

4.2 Exons mit Sequenzabweichungen

Im Folgenden sollen die Sequenzierungsergebnisse der Exons ausführlich beschrieben werden, in denen wir Abweichungen gegenüber der Wildtypsequenz zeigen konnten. Einen Vergleich zwischen den in unserem Kollektiv detektierten und in der Literatur beschriebenen Polymorphismen gibt die folgende Tabelle (Tabelle 4.2). Eine Darstellung der Mutationen unserer Studienpersonen mit ihrer Lage innerhalb des Kanalproteins ist an das Ende dieses Kapitels gestellt (Abbildung 4.16). Eine Auflistung der bislang publizierten SCN1A-Mutationen bei frühkindlichen myoklonischen Epilepsien findet sich im Anhang (Tabelle A5).

Tabelle 4.2: Polymorphismen im SCN1A-Gen in unserem Kollektiv

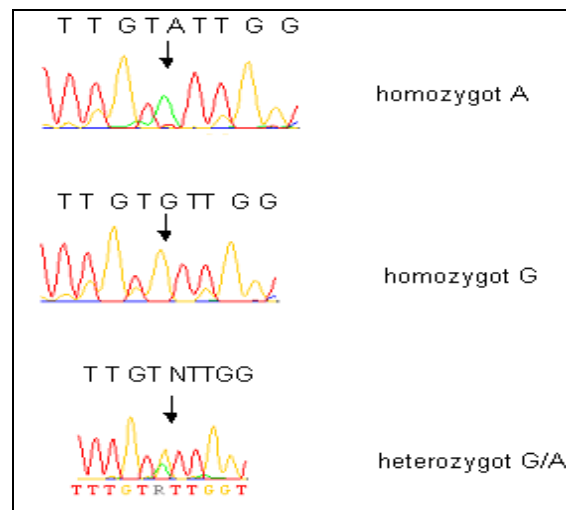
Basenaustausch (Position nach AB093548)	Exon	Autor	Frequenz (Normal- bevölkerung)	Frequenz (unser Kollektiv)
c.1212G>A	9	Escayg et al., 2001; Claes et al., 2003	0,33 0,63	0,28 (0,02 homozygot)
IVS10-60insC	IVS10	bisher nicht bekannt		0,54
c.2292C>T	13	Claes et al., 2003	0,47	0,3 (0,1 homozygot)
c.3199A>G→ T1067A	16	Escayg et al., 2001 Wallace et al., 2001b Fujiwara et al., 2003	0,30 0,33 0,20 heterozygot (0,02 homozygot)	0,2 (0,1 homozygot)
c.4731T>C	25	Escayg et al., 2001	0,01	0,02
c.5418G>A	26	Escayg et al., 2001	0,01	0,02

4.2.1 Exon 9

Polymorphismus

Zur Sequenzierung des neunten Exons verwandten wir je zwei Ansätze mit unterschiedlichen Primern in beiden Richtungen, um eine qualitativ hochwertige Sequenzierung zu erreichen. Bei 13 Personen fand sich an Position c.1212 ein heterozygoter Austausch von A gegen G, bei einer gesunden Kontrollperson lag ein homozygoter Basenaustausch vor (Abbildung 4.3). Hierbei handelt es sich um einen Polymorphismus, der keine Änderung in der Aminosäuresequenz hervorruft.

Abbildung 4.3: Polymorphismus c.1212A>G, Exon 9



Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus Exon 9 im Bereich des Polymorphismus c.1212A>G in den drei vorkommenden Varianten des homozygoten Vorliegens der Base A bzw. G und des heterozygoten Vorliegens beider Basen.

Mutation

Zusätzlich fanden wir in diesem Exon eine Mutation. Bei einer Patientin, deren Krankheitsverlauf in Kapitel 3.5.1 dargestellt wurde, liegt eine Insertion der Base C an Position c.1299 vor. Hierdurch wird das Leseraster von dieser Stelle an verschoben – L434fsX449. Die letzte korrekte Aminosäure ist das folgende Leucin, das sowohl durch die Wildtyp- als auch durch die verschobene Sequenz kodiert ist. Darauf folgen 14 abweichende Aminosäuren und dann ein vorzeitiges Stopp-Codon und damit ein Abbruch der Translation in das Kanalprotein noch innerhalb des neunten Exons. Die folgende Grafik macht dieses anschaulich (Abbildung 4.4).

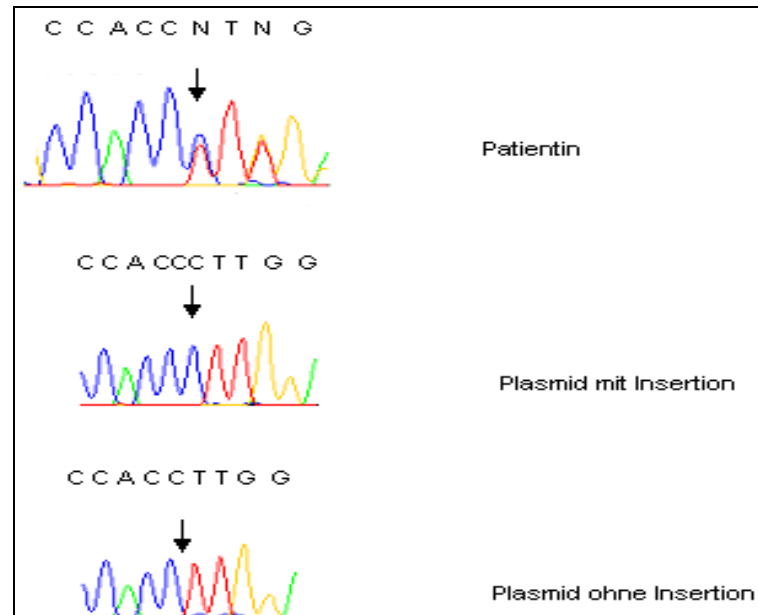
Abbildung 4.4: Frameshift-Mutation durch Insertion c.1299insC

Wildtyp																	
GCC	ACC	TTG	GAA	GAG	GCA	GAA	CAG	AAA	GAG	GCC	GAA	TTT	CAG	CAG	ATG	ATT	GAA
A	T	L	E	E	A	E	Q	K	E	A	E	F	Q	Q	M	I	E
Mutationsvariante																	
GCC	ACC	CTT	GGA	AGA	GGC	AGA	ACA	GAA	AGA	GGC	CGA	ATT	TCA	GCA	GAT	GAT	TGA
A	T	L	G	R	G	R	T	E	R	G	R	I	S	A	D	D	X

Abgebildet ist die Veränderung der DNA- sowie der Aminosäuresequenz im Vergleich zum Wildtyp, die durch die frame-shift-Mutation c.1299insC hervorgerufen wird. Rot markiert ist dabei die inserierte Base.

Zur Bestätigung und präzisen Darstellung der in der Sequenzierung des PCR-Produktes der Ausgangs-DNA gefundenen Mutation diente die zusätzliche Klonierung der beiden Allele, die eine getrennte Sequenzierung der Einzelstränge ermöglicht (Abbildung 4.5).

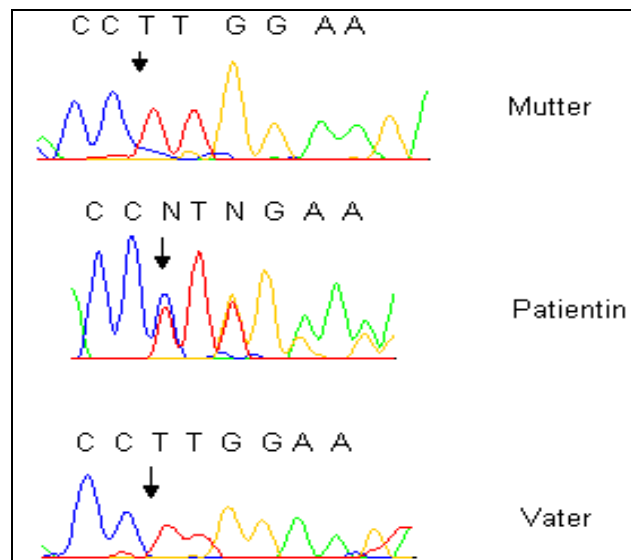
Abbildung 4.5: Mutation c.1299insC (L434fsX449), Exon 9 – genomische DNA, Klonierung



Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz im Bereich der Mutation in Form einer Insertion der Base C an Position c.1299, die bei der Patientin heterozygot vorliegt. Darunter sind die Sequenzen dieses Bereichs in den beiden Varianten der hergestellten Plasmide mit und ohne die Insertion wiedergegeben.

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei der Mutation um eine Neumutation oder eine von einem Elternteil vererbte Veränderung handelt, ist dieser Genabschnitt der elterlichen DNA ebenfalls untersucht worden (Abbildung 4.6). Abgesehen von dem Vorliegen des oben beschriebenen Polymorphismus c.1212A>G beim Vater finden sich bei diesen keine Sequenzabweichungen.

Abbildung 4.6: Mutation c.1299insC (L434fsX449), Exon 9 – Patientin und Eltern

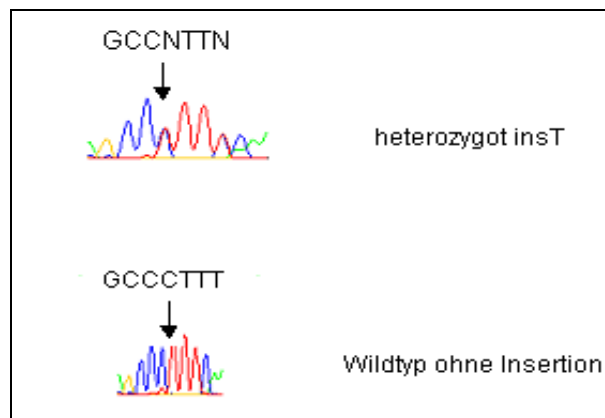


Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz des betroffenen Kindes sowie der gesunden Eltern im Bereich der Mutation c.1299insC in Exon 9, aus der ein Verschieben des Leserasters mit der letzten übereinstimmenden Base Leucin an Position 434 und einem vorzeitigen Stopp-Codon an Position 449 resultiert. Bei der Patientin liegt eine Heterozygotie mit Insertion der Base C in einem der Stränge vor, bei den Eltern die homozygote Wildtypvariante ohne diese Base.

4.2.2 Exon 10

Die Sequenzierung dieses Exons gestaltete sich bei einem Teil der untersuchten DNA-Proben schwierig. Bei Verwendung des ursprünglichen Primers f kam es bei 27 der 50 Personen zu einem Doppelsignal in der Sequenz im Sinne zweier gegeneinander verschobener Allele (Abbildung 4.7). Als Ursache fand sich eine 1-Basenpaar-Insertion 60 Basenpaare vor dem 5'-Ende des Exons. Zur Lösung dieses Problems führten wir zusätzlich Sequenzierungen mit einem hinter dieser Stelle liegenden Primer – 10f3 – durch.

Abbildung 4.7: Polymorphismus IVS10-60insT, IVS10



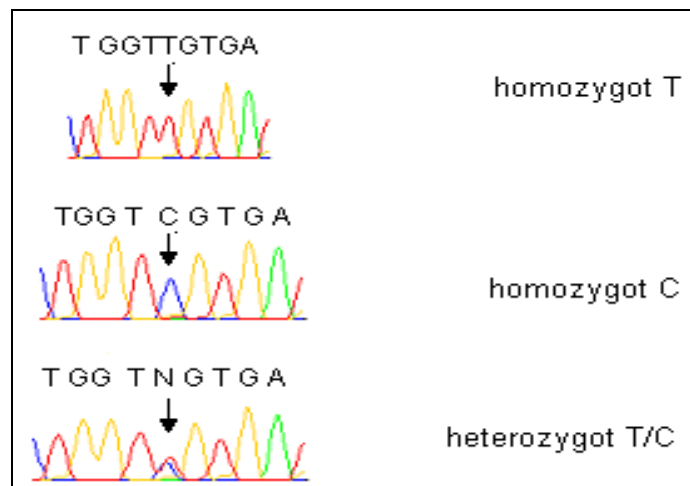
Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus dem Intron vor Exon 10 im Bereich des Polymorphismus IVS10-60insT in der Wildtypvariante ohne und der Mutationsvariante mit heterozygoter Insertion der Base T.

Zur Klärung der Frage, inwieweit diese in unserem Kollektiv in nahezu 50 % vorkommende Sequenzalteration pathogenetische Bedeutung hat, untersuchten wir die entsprechende Region in der DNA nicht an einer Epilepsie erkrankter Personen. Auch hier fand sich die Insertion in nahezu 50 % (5 von 12). Wir können somit mit hinreichender Sicherheit davon ausgehen, dass es sich hier nicht um eine erkrankungsspezifische Sequenzvariation, sondern um einen häufigen Polymorphismus handelt.

4.2.3 Exon 13

In Exon 13, das mit Hilfe der Primer 13f, 13r und 13r2 sequenziert wird, zeigen 15 der 50 untersuchten Personen an Position c.2292 einen heterozygoten, fünf einen homozygoten Basenaustausch von C nach T (Abbildung 4.8). Eine Alteration der Aminosäuresequenz ergibt sich hieraus nicht, da es sich um die letzte Base des Triplets handelt.

Abbildung 4.8: Polymorphismus c.2292C>T, Exon 13

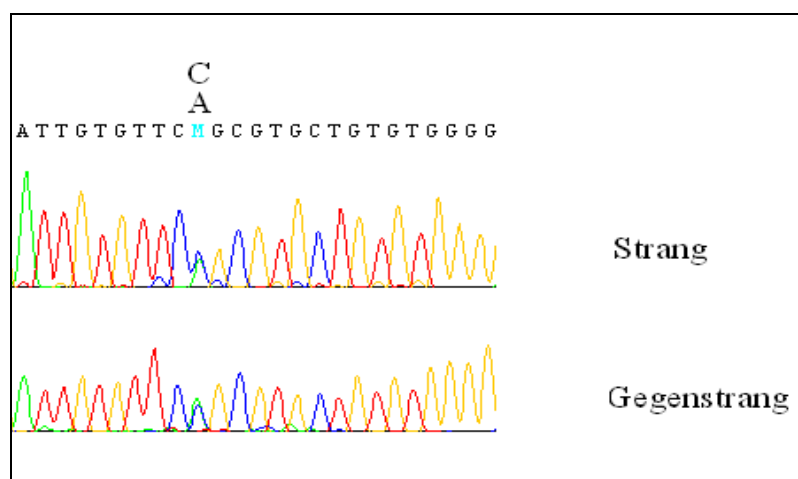


Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus Exon 13 im Bereich des Polymorphismus c.2292C>T in den drei vorkommenden Varianten des homozygoten Vorliegens der Base T bzw. C und des heterozygoten Vorliegens beider Basen.

4.2.4 Exon 15

Auch im 15. Exon fanden wir eine Mutation bei einem der untersuchten Patienten, dessen Fallgeschichte unter 3.5.3 geschildert ist. Es handelt sich um den heterozygoten Austausch von C nach A (Abbildung 4.9), was in einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Serin (R936S) im Bereich der hoch konservierten Kanalpore resultiert.

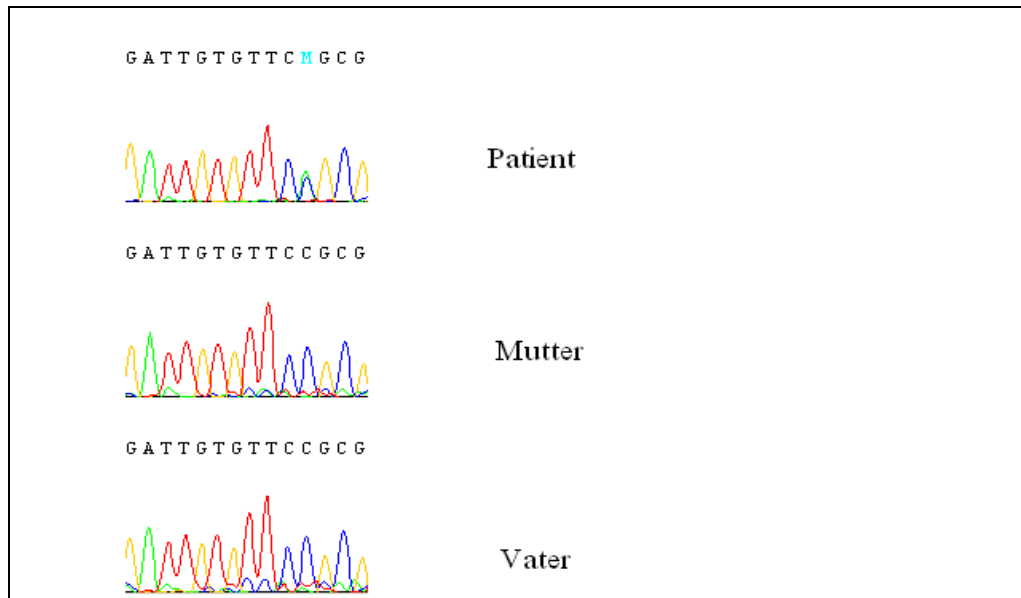
Abbildung 4.9: Mutation c.2824C>A (R936S); Exon 15



Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus Exon 15 im Bereich der Mutation c.2824C>A aus der der Austausch der Aminosäure Arginin gegen Serin an Position 936 (R936S) folgt. Es ist das Sequenzbild der DNA des betroffenen Kindes in 3'-5'- sowie in 5'-3'-Richtung abgebildet.

Weder bei der Mutter noch beim Vater konnte die Mutation gefunden werden (Abbildung 4.10); es handelt sich damit bei dem Patienten um eine Neumutation.

Abbildung 4.10: Mutation c.2824C>A (R936S); Exon 15 – Patient und Eltern

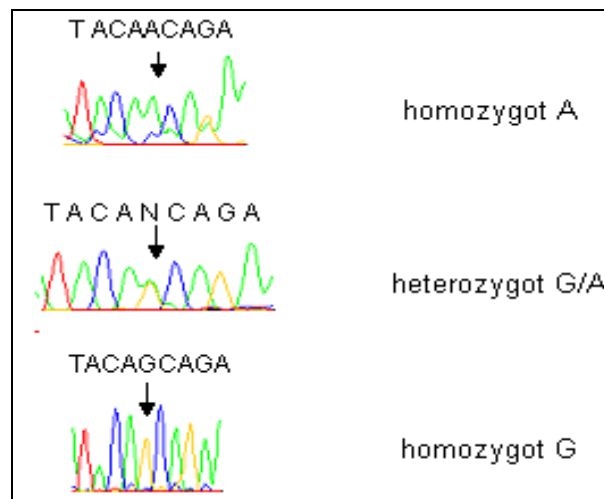


Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus Exon 15 im Bereich der Mutation c.2824C>A in der heterozygoten Mutationsvariante mit dem gleichzeitigen Vorliegen der Basen C und A bei dem betroffenen Patienten sowie in der Wildtypvariante mit homozygotem Vorliegen der Base C bei den nicht betroffenen Eltern.

4.2.5 Exon 16

Exon 16 wurde von uns mit drei Primern in 5'-3'-Richtung – 16f, 16f2, 16f3 – und einem Primer in Gegenrichtung sequenziert. Bei drei unserer Proben lag ein homozygoter, bei zehn Proben ein heterozygoter Basenaustausch von A nach G an Position c.3199 vor (Abbildung 4.11). Hierdurch wird in der Aminosäuresequenz Threonin durch Alanin ersetzt. Diese Änderung der Aminosäuresequenz wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen bei etwa einem Drittel der untersuchten Personen gefunden. In großen Vergleichsuntersuchungen an gesunden Kontrollpersonen fand sie sich in entsprechender Häufigkeit, so dass klar ist, dass es sich hier nicht um eine pathogenetisch bedeutsame Mutation, sondern um einen Polymorphismus vermutlich ohne funktionelle Relevanz handelt.

Abbildung 4.11: Polymorphismus c.3199A>G → T1067A, Exon 16

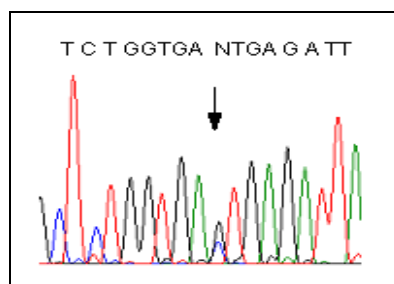


Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus Exon 16 im Bereich des Polymorphismus c.3199A>G, aus dem ebenfalls auf Proteinebene Varianten entstehen (T1067A), in den drei vorkommenden Varianten des homozygoten Vorliegens der Base G (in der AS-Sequenz T) bzw. A (in der AS-Sequenz A) und des heterozygoten Vorliegens beider Basen und Aminosäuren.

4.2.6 Exon 18

Bei einer Patientin, deren Fallgeschichte unter 3.5.2 zusammengefasst ist, zeigte sich in der Analyse dieses Gens eine Mutation in Form eines heterozygoten Basenaustausches von G nach C an Position IVS18+5 (Abbildung 4.12). Er befindet sich damit in der für die Prozessierung der RNA elementaren Splice-site-Donor-Region, betrifft allerdings nicht eine der am stärksten konservierten ersten beiden Basen dieses Abschnitts.

Abbildung 4.12: Mutation IVS18+5G>C, Splice-Donor-Site Exon 18

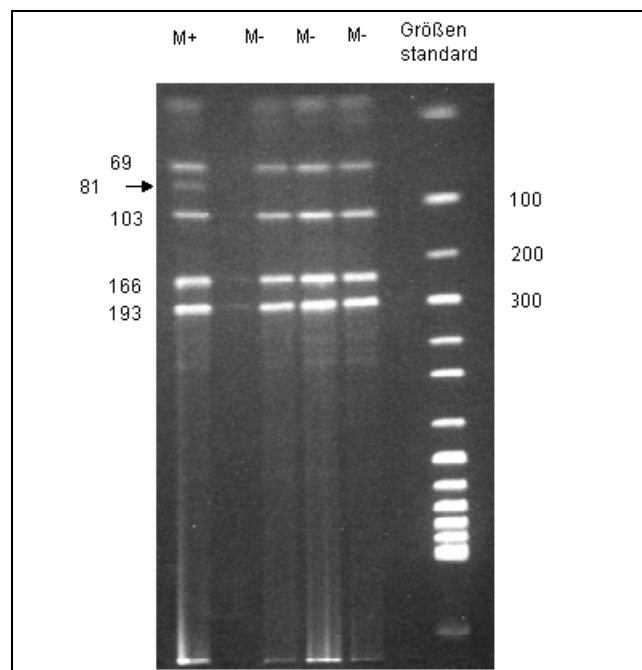


Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus dem Intron nach Exon 18 im Bereich der heterozygoten Mutation IVS18+5G>C.

Um zu klären, ob es sich hier um eine Neumutation handelt, führten wir bei den gesunden Eltern ebenfalls die Sequenzierung dieses DNA-Abschnitts durch. Beide zeigten die übliche Base G an der betreffenden Position.

Anschließend untersuchten wir an Proben von 100 nicht an einer neurologischen Erkrankung leidenden Personen mitteleuropäischer Herkunft, ob und wie oft sich der bei unserer Patientin vorliegende Basenaustausch finden lässt. Hierzu verwandten wir eine Restriktionsanalyse mit einem Enzym – DdeI –, dessen Erkennungssequenz – C^ATNAG (geschnitten wird zwischen C und T) – nur durch den gefundenen Austausch von G nach C entsteht. Die Längen der entstehenden Fragmente sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. In keiner der Kontrollproben fand sich das entsprechende zusätzliche Fragment (Abbildung 4.13).

Abbildung 4.13: Restriktionsfragmentauftrennung PCR-Produkt Exon 18 (Agarosegel)



In dieser Abbildung ist die Fotografie des 4 %igen Agarose-Gels nach Färbung mit Ethidiumbromid, auf das die Fragmente der Restriktionsanalyse des Exon 18 in Wildtyp- und Mutationsvariante (bezogen auf die Sequenz der Splice-Donor-Site) aufgetragen wurden. Die Fragmentlängen sind in kb angegeben. Die 22-bzw-36-kb-Fragmente sind auf Grund ihrer Kürze nicht sicher erkennbar aufgetrennt.

Tabelle 4.3: Länge der Fragmente nach Restriktion des PCR-Produkts 18 mit DdeI

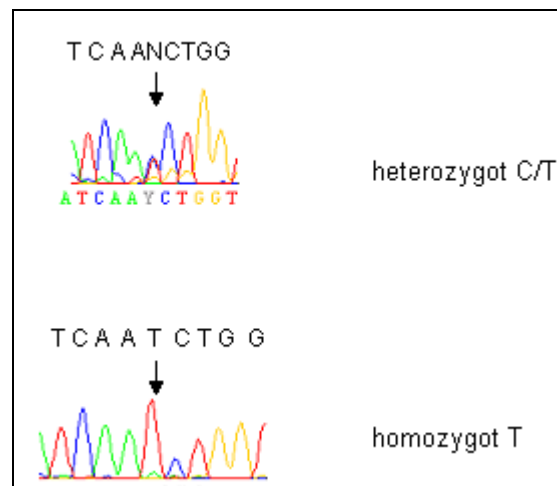
Fragmentlänge (kb)	Vorkommen
22	Mutationsallel
36	Wildtypallel; Mutationsallel
69	Wildtypallel; Mutationsallel
81	Mutationsallel
103	Wildtypallel
166	Wildtypallel; Mutationsallel
193	Wildtypallel; Mutationsallel

Ein weiterer Schritt zur Sicherung der pathogenetischen Relevanz der Mutation war es, mittels sog. Splice-site-predictor-Programme zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmten Stelle für das Splicing wichtig ist, zu prüfen, ob es – wie von uns angenommen – durch die bei unserer Patientin gefundene Veränderung der Basenabfolge zu einem Wegfall der Splice-Donor-Site kommt. Diese Hypothese konnte durch zwei von einander unabhängige Programme bestätigt werden (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html - Reese et al., 1997; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/> - Hebsgaard et al., 1996). Im Falle des Wildtyps wird die Sequenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 97 % als Splicingstelle bezeichnet, während hingegen im Falle der Mutation die Splicing-Wahrscheinlichkeit für diesen Sequenzabschnitt bei unter 10 % liegt. In beiden Fällen findet sich 20 Basen weiter intronisch eine aberrante Splice-Stelle.

4.2.7 Exon 25

In diesem Genabschnitt weist eine unserer Patientinnen einen Polymorphismus in Form eines Austausches von T gegen C an Position c.4731 auf (Abbildung 4.14). Eine Auswirkung auf die Aminosäureabfolge hat diese Änderung nicht.

Abbildung 4.14: Polymorphismus c.4731T>C, Exon 25

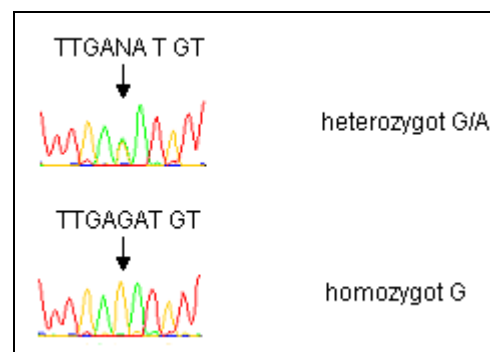


Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus Exon 25 im Bereich des Polymorphismus c.4731T>C in den drei vorkommenden Varianten des homozygoten Vorliegens der Base C bzw. T und des heterozygoten Vorliegens beider Basen.

4.2.8 Exon 26

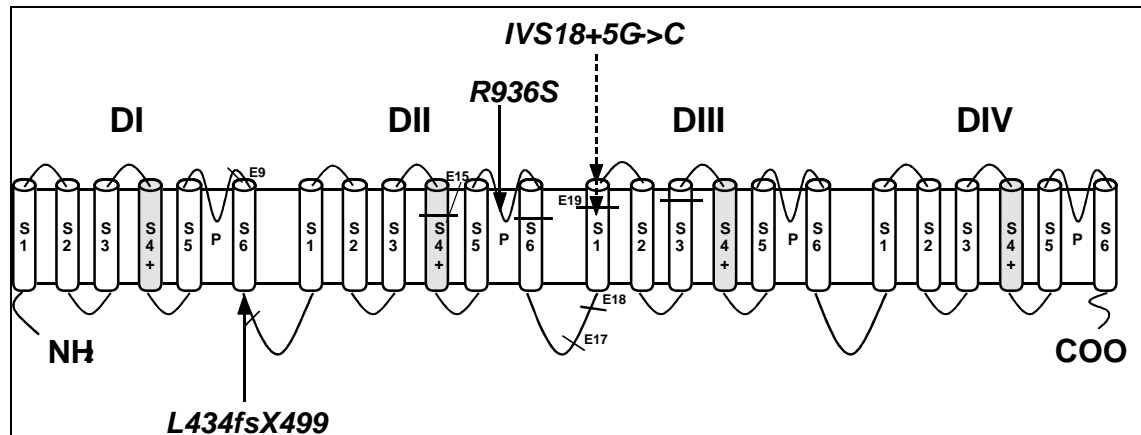
Dieses letzte Exon des SCN1A-Gens ist mit 1.182 Basenpaaren das mit Abstand längste aller Exons. Amplifiziert wurde es daher in mehreren Abschnitten. Hierzu standen je drei Primer in beiden Richtungen zur Verfügung, die in unterschiedlicher Kombination – für die meisten Proben 26af/ar + 26bf/cr oder 26af/cr – für die PCR eingesetzt wurden. Zur Sequenzierung wurden alle sechs Primer verwandt, um den gesamten Bereich darzustellen. Bei einer Person fand sich an Position c.5418 ein heterozygoter Austausch der Base G durch A (Abbildung 4.15). Es handelt sich um einen stummen Polymorphismus.

Abbildung 4.15: Polymorphismus c.5418G>A, Exon 26



Abgebildet ist das Elektropherogramm der DNA-Sequenz aus Exon 26 im Bereich des Polymorphismus c.5418G>A in den drei vorkommenden Varianten des homozygoten Vorliegens der Base G bzw. A und des heterozygoten Vorliegens beider Basen.

Abbildung 4.16: Schematischer Überblick über den Aufbau der $\alpha 1$ -Untereinheit des Natriumkanals SCN1A mit den in dieser Arbeit neu beschriebenen Mutationen



Diese Grafik zeigt schematisch den Aufbau der $\alpha 1$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals. Die Transmembransegmente sind mit S1-S6 bezeichnet, die ionendurchlässige Pore mit P. Das + kennzeichnet die Position des Spannungssensors. DI-DIV stehen für die Domänen des Kanals. Die Querstriche zeigen Beginn und Ende des durch das jeweilige Exon – bezeichnet mit E und Nummer – codierten Abschnittes an, wobei hier nur die mit Relevanz für die in dieser Arbeit neu beschriebenen Mutationen eingezeichnet sind. Die ungefähre Position der Mutationen ist mit Pfeilen verdeutlicht.

5 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit zum einen Mutationen im SCN1A-Gen, das für das Syndrom der generalisierten Epilepsie mit Fieberkrämpfen Plus und für die schwere myoklonische Epilepsie des Kindesalters von großer Bedeutung ist, auch bei der Entstehung der myoklonisch-astatischen Epilepsie und der frühkindlichen Grand mal-Epilepsie eine Rolle spielen und wie zum zweiten bestimmte Mutation(styp)en mit klinisch definierten Anfallsformen korrelieren. Hierzu untersuchten wir die DNA-Proben von 50 Personen mit verschiedenen Formen der frühkindlichen myoklonischen Epilepsie.

5.1 Polymorphismen

Vorbekannte Polymorphismen

Wir konnten in unserer Gruppe mehrere exonische Polymorphismen in einer ähnlichen Häufigkeit nachweisen, wie sie in großen Populationsstudien (Escayg et al., 2001; Wallace et al., 2001b; Claes et al., 2003) ermittelt worden ist. Hieraus lässt sich schließen, dass unser Kollektiv bezüglich des genetischen Hintergrundes mit diesen vergleichbar und unsere Analysetechnik hinreichend präzise ist. Andere sehr selten vorkommende Polymorphismen fanden sich bei uns nicht. Dieses liegt am ehesten in der vergleichsweise geringen Personenzahl begründet.

In Exon 16 kam es bei 30 % unserer Proben zu einem hetero- oder auch homozygoten Basenaustausch, der Konsequenzen für die Aminosäuresequenz des codierten Proteins hat – c.3199A>G führt zum Einbau von Alanin anstelle von Threonin. Diese Sequenzabweichung ist jedoch in der Literatur bereits beschrieben, und große Populationsstudien durch mehrere Arbeitsgruppen (Escayg et al., 2001; Wallace et al., 2001b; Fujiwara et al., 2003) zeigten, dass es sich hier um einen pathogenetisch bedeutungslosen Polymorphismus handelt, der sowohl in der kaukasischen als auch der japanischen Normalbevölkerung mit einer Häufigkeit von 20 – 33 % vorkommt. Wir ordneten diesen Befund daher als auch für unser Kollektiv pathogenetisch nicht relevant ein.

Eine Übersicht über die in der Literatur zu findenden exonischen Polymorphismen und die Auftretenshäufigkeit in unserer Studie gibt Tabelle 5.1

Tabelle 5.1: Polymorphismen im SCN1A-Gen

Basenaustausch	Exon	Autor	Frequenz (Normalbevölkerung)	Frequenz (unser Kollektiv)
c.429G>A*	3	Claes et al., 2003	0,03	0/50
c.1145°>C*	8	Escayg et al., 2001	0,02	0/50
c.1212G>A	9	Escayg et al., 2001	0,33	14/50
		Claes et al., 2003	0,63	(1/50 homozygot)
IVS10-60insC	IVS10	bisher nicht bekannt		27/50
c.2292C>T	13	Claes et al., 2003	0,47	15/50
				(5/50 homozygot)
c.2522C>G*	14	Wallace et al., 2001b	0,09	0/50
c.2889T>C	15	Wallace et al., 2001b	0,01 (bei GEFS+)	0/50
c.3199A>G→ T1067A	16	Escayg et al., 2001	0,30	10/50
		Wallace et al., 2001b	0,33	(5/50 homozygot)
		Fujiwara et al., 2003	0,20 heterozygot (0,02 homozygot)	
c.3521C>G→ T1174S	17	Escayg et al., 2001	0,01	0/50
c.4731T>C	25	Escayg et al., 2001	0,01	1/50
c.5418G>A	26	Escayg et al., 2001	0,01	1/50
c.5782C>G→ R1928G	26	Wallace et al., 2001b	0,17	0/50

Basen-Position nach AB093548, wenn nicht mit * gekennzeichnet (dann unverändert aus Originalarbeit übernommen).

Nicht vorbekannte Polymorphismen

Bei etwa der Hälfte – 27/50 – unserer Proben zeigten sich bei der Analyse des Exon 10 zwei sich überlagernde Sequenzen. Hier handelte es sich um die beiden Allele des Gens, die normalerweise synchron identische Fluoreszenzsignale abgeben und somit gemeinsam im Elektropherogramm abgebildet werden bzw. im Falle einer Punktmutation an dieser Stelle durch zwei verschiedene übereinanderliegende Basensignale zur Darstellung kommen. Im vorliegenden Fall fanden sich aber über die gesamte Länge des Exons solche Doppelsignale. Bei der genauen Analyse zeigte sich, dass es sich hierbei um zwei um eine Position verschobene identische Basenfolgen handelte. Wir vermuteten, dass es vor Beginn des analysierten Bereichs zu einer Insertion oder Deletion einer Base gekommen sein müsse, und analysierten daher auch den intronischen Sequenzabschnitt des verwendeten PCR-Produktes. Dabei fanden wir 60 Basen vor Beginn des Exon 10 die heterozygote Insertion einer Base – IVS10-60insT.

Die große Häufigkeit dieser Insertion in dem von uns untersuchten Kollektiv legte die Vermutung nahe, dass es sich hier um einen Polymorphismus und nicht um eine pathogenetisch bedeutsame Mutation handelt. Um diese Hypothese zu untermauern, prüften wir sie an einer Gruppe zwölf nicht neurologisch erkrankter Personen. Auch hier bestätigte sich die fast ausgeglichene Häufigkeit von Sequenzen mit und ohne diese Insertion – 5 gegenüber 7. Wir hielten unsere Annahme damit für hinreichend belegt und führten keine weiteren Untersuchungen durch.

5.2 Mutationen

Bei den verschiedenen Formen der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien wurden bisher Mutationen im SCN1A-Gen in sehr unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen (Tabelle A5 im Anhang). Ebenso zeichnen sich einige syndromspezifische Charakteristika bezüglich der Mutationsform ab. Alle Mutationen sind heterozygot, fast immer handelt es sich um Neumutationen. Mit wenigen Ausnahmen konnten die identischen Mutationen bislang nicht bei mehreren Betroffenen gefunden werden, sondern nahezu jeder Patient scheint eine „private“ Mutation aufzuweisen. Es scheint allerdings einige häufiger involvierte Genabschnitte geben. So betrifft ungefähr ein Drittel aller Mutationen den porenbildenden Bereich des Kanals (Tabelle A2 im Anhang); unter Miteinbe-

ziehung der GEFS+-Gruppe fallen gut zehn Prozent in den Bereich des Spannungssensors (Ceulemans et al., 2004). In den intrazellulären, die Segmente und Domänen verbindenden, Schleifen kommen weit überwiegend trunkierende Mutationen vor – die in der gesamten Gruppe etwa die Hälfte ausmachen –, während die nur eine Aminosäure austauschenden Missense-Mutationen in den Transmembransegmenten liegen (Tabelle A2 und A5 im Anhang).

5.2.1 Myoklonisch-astatische Epilepsie

Bislang wurden nur bei sieben Personen mit einer MAE Mutationen nachgewiesen. In allen Fällen waren sie Mitglieder von Familien mit einem GEFS+-Syndrom. Dreimal – dabei 2 Mitglieder einer Familie – lag die Mutation im Gen für den GABA-Kanal GABRG2 (Wallace et al., 2001a; Harkin et al., 2002), je einmal im Gen für die β -Untereinheit Typ 1 – SCN1B und die α -Untereinheit Typ 2 – SCN2A des Natriumkanals (Wallace et al., 1998; Sugawara et al., 2001b). Die beiden übrigen Mutationen betrafen die auch in dieser Studie untersuchte α -Untereinheit Typ 1 – SCN1A (Escayg et al., 2001; Wallace et al., 2001b). Bei allen Mutationen in den Natriumkanalgenen handelte es sich um Punktmutationen, die zu einem einzelnen Aminosäureaustausch, nicht aber zu einer Verschiebung des Leserasters oder einem vorzeitigen Stopp-Codon führten.

Wir detektierten bei einer der 21 an einer sporadischen MAE erkrankten Personen unseres Kollektivs eine neu entstandene heterozygote Insertionsmutation – c.1299insC; L434fsX449 –. Es handelt sich dabei um eine Patientin aus der Gruppe, die Professor Doose zur Erstbeschreibung dieser Krankheitsentität heranzog; aufgrund des klinischen Verlaufs mit sehr früher Manifestation lassen sich bei ihr jedoch Überschneidungen zur SMEI erkennen (vgl. auch die Fallgeschichte dieser Patientin, die unter 3.5.1 zusammengefasst ist). Es handelte sich bei der nachgewiesenen Mutation um die erste bei einer MAE außerhalb des familiären GEFS+-Syndrom berichtete Mutation. Damit konnten wir im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um Nabbout (2003b), die bei der Analyse von 22 DNA-Proben von MAE-Patienten keine Mutation nachweisen konnten, zeigen, dass auch bei dieser Form der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien genetisch bedingte Störungen eines zentral exprimierten Ionenkanals eine Rolle spielen können.

Eine Mutation im SCN1A-Gen bei einem Menschen mit einer klassischen MAE ist weiterhin unbekannt.

Durch die das Leseraster verschiebende Veränderung der Basenabfolge entstehen in der Folge 14 vom Wildtyp abweichende Aminosäuren codierende Triplets und dann ein Stopp-Codon. Daraus resultiert ein Abbruch der Translation im Segment 6 der ersten Domäne des Kanalproteins. Die Position der Mutation ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Es ist naheliegend, dass dadurch dessen Funktion deutlich beeinflusst wird. Welche Auswirkungen solche Veränderungen auf die weitere Prozessierung und letztendliche Funktion desselben haben, ist für einige Beispiele experimentell geklärt, ist teilweise aber auch noch Gegenstand hypothetischer Überlegungen. Das Spektrum reicht hier von einer gesteigerten Aktivierbarkeit oder einer Veränderung der Spannungssensitivität über eine verzögerte Inaktivierung bis hin zu Konzepten eines gestörten Kanalauf- und -abbaus, quantitative Defizite im Sinne einer Haploinsuffizienz oder eine negative Dominanz der verkürzten oder nicht korrekt gebildeten Proteine auf die funktionstüchtigen werden ebenso diskutiert (Alekov et al., 2001; Claes et al., 2001; Spanpanato et al., 2003a, b).

5.2.2 Schwere myoklonische Epilepsie des Kindesalters

Für die SMEI sind SCN1A-Mutationen von großer Bedeutung. Sie konnten in mehreren großen Studien mit Häufigkeiten von 30 – 100 % nachgewiesen werden (Ohmori et al., 2002; Sugawara et al., 2002; Claes et al., 2003; Fujiwara et al., 2003; Fukuma et al., 2004). Gut die Hälfte dieser Mutationen – nach Angaben einer Arbeitsgruppe sogar 94 % (Ceulemans et al., 2004) – führen als Nonsense- oder Frame-shift-Mutation zur Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons und damit zum Translationsabbruch vor Ende der Aminosäuresequenz. Folge davon ist im Normalfall die Synthese eines trunkierten Kanalproteins mit den oben bereits aufgezeigten Konsequenzen für die Funktion desselben.

In unsere Gruppe waren nur zwei Mädchen mit einer SMEI eingeschlossen. Dennoch fanden wir bei einer von ihnen ebenfalls eine Mutation. Auch hier handelte es sich um eine heterozygote Neumutation. Sie betraf die fünfte Base der Splice-Donor-Site des Exon 18 (IVS18+5G>C). An dieser Position ist die Sequenz nicht so hoch konserviert

wie an denen der ersten beiden direkt hinter dem Exon liegenden Basen. Somit ist die Auswirkung eines hier auftretenden Basenaustausches auf das Splicing der RNA nicht von vorne herein eindeutig. Um auszuschließen, dass es sich um einen pathogenetisch eher irrelevanten Polymorphismus handelt, untersuchten wir daher diesen Sequenzabschnitt in einem Kontrollkollektiv von 100 nicht neurologisch erkrankten Mitteleuropäern. Wir setzten dazu eine Restriktionsanalyse ein, zu der wir ein Enzym verwendeten, für das durch die Mutation eine zusätzliche Schnittstelle entsteht. Ein Enzym, das nur im Falle der Wildtypsequenz schneidet, war nicht verfügbar. Wir fanden in der Kontrollgruppe ebenso wie bei den anderen Personen unseres eigentlichen Studienkollektivs in keinem Fall den bei der SMEI-Patientin gefundenen Basenaustausch von G nach C. Die Tatsache, dass beide Eltern an der betreffenden Stelle ebenfalls die Wildtypsequenz aufweisen, unterstützt zusätzlich die Annahme, dass im Fall unserer Patientin eine relevante Mutation stattgefunden hat. Dieses konnte auch mithilfe zweier Programme zur Vorhersage für die Auftretenswahrscheinlichkeit von Splicing an bestimmten Sequenzabschnitten untermauert werden; es zeigte sich ein Verlust der Splice-Donor-Site durch die Mutation mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90 % (Reese et al., 1997; Hebsgaard et al., 1996).

Bemerkenswert ist, dass zwei der sechs bislang bekannten Splice-Site-Mutationen bei SMEI-Patienten in diesem Gen ebenfalls in der Splice-Donor-Site des Exon 18 liegen – IVS18+1G>T – (Nabbout et al., 2003a; Wallace et al., 2003). Eine weitere führt zu einem Austausch der ersten Base der Splice-Donor-Site hinter Exon 4 – IVS4+1G>A – (Fujiwara et al., 2003). Die drei anderen betreffen das Splicing des Exon 22, wobei eine in die Splice-Acceptor-Site – IVS-14G>T – (Nabbout et al., 2003a), die beiden anderen in die Donor-Site – IVS22+1G>T – (Claes et al., 2001; Wallace et al., 2003) fallen. Alle vorbeschriebenen Mutationen im Bereich der Splice-Donor-Site tauschen also eine der hoch konservierten beiden dem Exon nächsten Basen aus.

Eine Veränderung der Splice-Site-Sequenz hat Auswirkungen auf die posttranskriptionelle Weiterverarbeitung der mRNA, denn beim Splicing werden normalerweise die intronischen Bereiche ausgeschnitten und die exonischen Abschnitte somit in eine direkte Reihe gebracht. Diese wird dann in die Aminosäuresequenz des Kanalproteins übersetzt. Infolge eines fehlerhaften Splicings kann es bei unserer Patientin zu einem Wegfall des entsprechenden Exons 18 oder aber auch zur Integration des Introns 17 in

die mRNA kommen. Dieses hat gerade im Fall des Exon 18 große Auswirkungen, da es ein Basentriplett gibt, das in Exon 17 beginnt und in Exon 18 endet. Fällt also letzteres weg oder bleibt ein Zwischenabschnitt erhalten, so kommt es zu einer Verschiebung des gesamten Leserasters und damit zu einer veränderten Aminosäurenkette und mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem vorzeitigen Stopp-Codon. Möglich ist auch, dass eine eigentlich untergeordnete alternative Splice-Site aktiviert wird; hier kommt zum Beispiel eine durch das oben bereits erwähnte Programm zur Vorhersage von Splice-Sites erkannte Stelle 20 Basen weiter intronwärts in Frage, was ebenfalls zu einem trunkierten Protein führen wird.

5.2.3 Frühkindliche Grand mal-Epilepsie

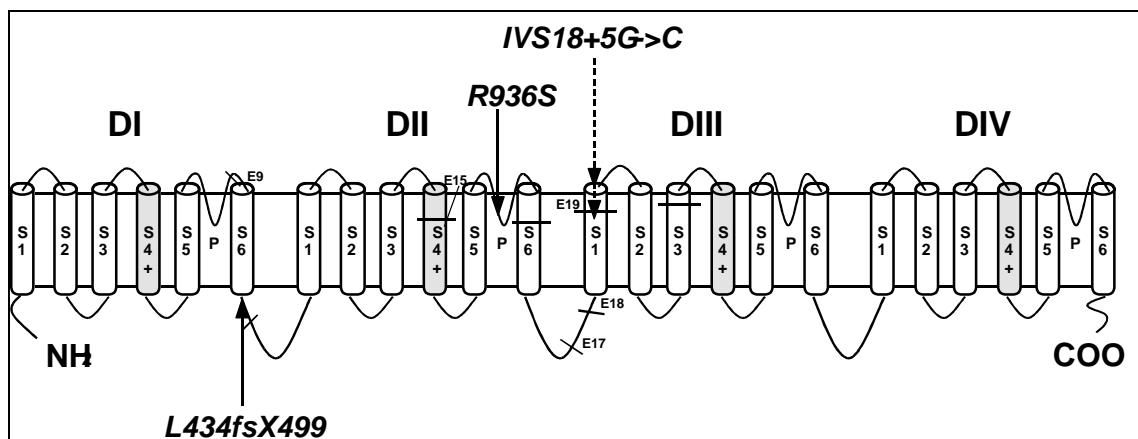
Bislang wird nur in einer einzigen Arbeit von einer Mutationsanalyse bei frühkindlicher Grand-Mal-Epilepsie mit alternierendem Hemi-Grand mal berichtet. Dabei wurden in einer Gruppe von zehn japanischen Kindern bei acht positive Befunde bei der Analyse des SCN1A-Gens erhoben (Fujiwara et al., 2003).

In der entsprechenden Untergruppe unseres Kollektivs mit 17 Personen fand sich bei einem Kind eine Mutation. Es handelt sich um eine Missense-Mutation, durch die im Bereich der hoch konservierten Pore des Kanalproteins die basische Aminosäure Arginin durch die neutrale Aminosäure Serin ersetzt wird (c.2824C>A→R936S). In direkter Nachbarschaft hierzu wurden durch andere Arbeitsgruppen ebenfalls Missense-Mutationen bei Patienten mit schwerer myoklonischer Epilepsie gefunden – c.2772G>C→M934I (Fukuma et al., 2004); c.2871C>G→H939Q (Claes et al., 2003). Wie in letztgenannter Arbeit postuliert, gehen auch wir davon aus, dass ein solcher Aminosäurenaustausch in diesem funktionell extrem wichtigen Teil des Kanalproteins zu einer relevanten Beeinflussung der Funktion führt; dieses wird auch von anderen angenommen (Fukuma et al., 2004; Nabbout et al., 2003a) und ist z.B. für die hyperkaliämische periodische Paralyse experimentell nachgewiesen (Bendahhou et al., 1999).

Nur einer unserer 17 mitteleuropäischen Patienten mit diesem Epilepsiesyndrom wies im untersuchten Gen eine Mutation auf. Bei der SMEI-Patientin, die eine Mutation im Bereich der Splice-Site des Exon 18 trägt, zeigten sich klinisch große Überschneidungen mit einer früh beginnenden und schwer verlaufenden FKGM, so dass auch eine Zu-

ordnung zu diesem Epilepsiesyndrom vertretbar wäre. Auch dann wäre aber die Mutationsfrequenz im Vergleich zur japanische Studie sehr niedrig. Die große Diskrepanz zwischen den beiden Studienergebnissen könnte durch den unterschiedlichen ethnischen Hintergrund der untersuchten Populationen zumindest mitbedingt sein. In die Beurteilung sollte auch die geringe Größe der jeweils untersuchten Gruppen und die letztendlich nicht immer einheitlich gehandhabte Klassifizierung dieses Epilepsiesyndroms mit einfließen. Möglich ist auch, dass bei einigen Betroffenen ein kompletter Verlust eines Allels des Gens vorliegt, der sich durch unsere Analysetechnik nicht nachweisen lässt.

Abbildung 5.1: Schematischer Überblick über den Aufbau der $\alpha 1$ -Untereinheit des Natriumkanals SCN1A mit den in dieser Arbeit neu beschriebenen Mutationen



Diese Grafik zeigt schematisch den Aufbau der $\alpha 1$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals. Die Transmembransegmente sind mit S1-S6 bezeichnet, die ionendurchlässige Pore mit P. Das + kennzeichnet die Position des Spannungssensors. DI-DIV stehen für die Domänen des Kanals. Die Querstriche zeigen Beginn und Ende des durch das jeweilige Exon – bezeichnet mit E und Nummer – codierten Abschnittes an, wobei hier nur die mit Relevanz für die in dieser Arbeit neu beschriebenen Mutationen eingezeichnet sind. Die ungefähre Position der Mutationen ist mit Pfeilen verdeutlicht.

5.2.4 Vergleich der Unterformen

Sowohl für die SMEI als auch für die FKGM und die MAE sind mittlerweile Mutationen im SCN1A-Gen nachgewiesen. Damit bestätigt sich auch auf genetischer Ebene, dass diese drei Epilepsiesyndrome aus der Gruppe der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien grundlegende Gemeinsamkeiten haben. Die Überschneidungen scheinen aber weniger ausgeprägt zu sein als die im klinischen Bild. Bei der MAE und der FKGM spielen Mutationen in der $\alpha 1$ -Untereinheit des Natriumkanals eine untergeordnete Rolle, während 60 % der SMEI-Patienten eine solche aufweisen. Nabbout und Mitarbeiter (2003b) weisen im Hinblick auf die Differenz zwischen der MAE und den

klinisch verwandten Syndromen SMEI und GEFS+ bezüglich der genetischen Befunde darauf hin, dass letztere sich von ersterer auch durch ihre ausgeprägte Temperatursensibilität unterscheiden. Gegen die daraus abgeleitete Hypothese, dass gerade dieses klinische Merkmal direkt mit den SCN1A-Mutationen zusammenhänge, spricht aber die nach unseren Ergebnissen anzunehmende geringe Relevanz dieses Ionenkanalgens bei der Entstehung der FKGM.

Es zeichnen sich klare Unterschiede zwischen den Syndromen in der Art der jeweiligen Mutationen ab. So wurden bei der FKGM wie beim GEFS+ – bei dem in 17 % Mutationen im SCN1A-Gen gefunden werden (Scheffer & Berkovic, 2003) – bislang mit zwei Ausnahmen (Sugawara et al., 2002; Fukuma et al., 2004) nur Missense-Mutationen gefunden, die zu einem einzelnen Basen- und damit Aminosäurenaustausch führen. Bei der SMEI sind hingegen mehr als 50 % der zugrunde liegenden Mutationen Nonsense- oder Frameshift-Mutationen, also solche, die sofort zu einem Stopp-Codon führen oder durch ein Verschieben des Leserasters zunächst zu einer Reihe ausgetauschter Basen und nach unterschiedlich langem Intervall dann auch zu einem Stopp und damit dem vorzeitigen Abbruch der Translation führen. Eine Korrelation zwischen der Mutation und dem klinischen Bild ist innerhalb der SMEI-Gruppe jedoch noch nicht gelungen (Ohmori et al., 2002). Für die MAE sind Aussagen über die führende Mutationsform noch nicht zu treffen, da bislang nur zweimal innerhalb von GEFS+-Familien – jeweils Missense-Mutation – (Escayg et al., 2001; Wallace et al., 2001b) und jetzt einmal durch uns bei einer sporadischen Erkrankung – Frame-shift-Mutation – der Nachweis gelungen ist.

Es stellt sich vor dem Hintergrund der beschriebenen und der von uns nun hinzugefügten Daten die Frage nach klinischen Merkmalen einer frühkindlichen Epilepsie aus dem Kreis der myoklonischen Unterformen, die eine Mutation im SCN1A-Gen ausreichend wahrscheinlich machen und so eine molekulargenetische Analyse rechtfertigen bzw. nahe legen. Es sollten möglichst viele der in der folgenden Tabelle 5.2 genannten Kriterien erfüllt sein – es ist jeweils die Auftretenshäufigkeit des Symptoms unter den Patienten mit SCN1A-Mutation angegeben (Annesi et al., 2003; Claes et al., 2001, 2003; Escayg et al., 2000b, 2001; Fujiwara et al., 2003; Fukuma et al., 2004; Gennaro et al., 2003; Nabbout et al., 2003a; Ohmori et al., 2002, 2003; Sugawara et al., 2002; Wallace et al., 2003).

Eine detaillierte Auflistung der relativen Häufigkeit dieser Merkmale in den einzelnen Kollektiven gibt Tabelle A6 im Anhang wieder.

Tabelle 5.2: Kriterien für eine SCN1A-Analyse bei frühkindlichen myoklonischen Epilepsien

Kriterium	Auftretenshäufigkeit
normale Entwicklung bis zum Zeitpunkt der Erstmanifestation	99 %
Beginn febriler und/oder afebriler GTCS noch im 1. LJ	96 %
mentale Entwicklungsverzögerung im Verlauf	92 %
Therapierefraktärität/Anfälle bis ins Erwachsenenalter	89 %
Auftreten von myoklonischen Anfällen	75 %
Temperatursensibilität	74 %
Auftreten von Hemi-Grand mal	73 %
Entwicklung einer Ataxie	70 %

Nach: Annesi et al., 2003; Claes et al., 2001, 2003; Escayg et al., 2000b, 2001; Fujiwara et al., 2003; Fukuma et al., 2004; Gennaro et al., 2003; Nabbout et al., 2003a; Ohmori et al., 2002, 2003; Sugawara et al., 2002; Wallace et al., 2003

Für die Personen in der von uns untersuchten Gruppe, bei denen eine Mutation nachgewiesen werden konnte, gilt – entsprechend den oben aufgeführten Kriterien – einheitlich, dass es sich um zunächst gesunde, nach Beginn der Epilepsie zunehmend entwicklungsverzögerte Kinder handelt, die trotz intensiver Pharmakotherapie wiederholt febrile (Halbseiten-)Anfälle sowie myoklonische Anfälle erlitten und im Verlauf eine zumindest milde Ataxie entwickelten.

Dem in der an der Symptomatologie und dem Verlauf orientierten Klassifikation als spezifischem Merkmal erfassten Auftreten myoklonisch-astatischer Anfälle scheint hingegen keine besondere Verbindung zu SCN1A-Mutationen zuzukommen.

5.3 Weiterführende Untersuchungen

Bei einem Großteil der von uns untersuchten Patientinnen und Patienten mit einer Epilepsie aus dem Formenkreis der idiopathischen frühkindlichen myoklonischen Epilepsien konnten wir die ursächliche Mutation nicht finden. Es erscheint daher naheliegend, andere – im Zusammenhang mit generalisierten Epilepsien relevante – Gene zu untersuchen. Hier stehen die ebenfalls zu den „GEFS+-Genen“ zählenden Untereinheiten des Natriumkanals SCN1B und SCN2A an erster Stelle. Auch die weiteren im menschlichen Gehirn exprimierten Vertreter – SCN3A, SCN8A, SCN2B, SCN3B – sind sicherlich als Kandidaten für ursächliche Mutationen anzunehmen. Mutationen, die nicht exonisch sind, sondern im Bereich des Promotors liegen oder zu einem Verlust des gesamten Allels führen, werden durch die von uns durchgeführte Sequenzanalyse nicht entdeckt. Es ist daher möglich, dass auch bei Patienten, bei denen wir einem negativen Befund erhoben haben, die ursächliche Mutation dennoch im SCN1A-Gen liegt. Der Untersuchung der Promotorregion widmet sich zur Zeit eine Arbeitsgruppe um A. Escayg (Department of Human Genetics, University of Michigan, Ann Arbor), der wir DNA unserer Patientinnen und Patienten zur Verfügung gestellt haben.

Das ebenfalls im Rahmen des GEFS+-Syndroms bedeutsame Rezeptorgen GABRG2 ist auch im Zusammenhang sowohl mit reinen Fieberkrämpfen als auch mit Absence-Epilepsien bedeutsam, so dass gerade für die Untergruppe der Patienten mit frühkindlichen myoklonischen Epilepsien, zu deren Anfallsspektrum Absencen gehören, sicherlich auch in dieser Richtung weitere Untersuchungen zu begründen sind (Baulac et al., 2001, Kananura et al., 2002; Wallace et al., 2001; Harkin et al., 2002)

Ein anderer Ansatzpunkt weiterer Studien ergibt sich aus der auf den ersten Blick widersprüchlichen Situation, dass bislang bei frühkindlichen myoklonischen Epilepsien nahezu ausschließlich Neumutationen gefunden wurden, gleichzeitig aber bei ungefähr einem Drittel dieser Fälle eine hinsichtlich Epilepsien oder Fieberkrämpfen positive Familienanamnese zu erheben ist. Hypothetisch wird deshalb von einem polygenetischen Geschehen ausgegangen, bei dem mehrere Mutationen zusammenwirken müssen, um das jeweilige klinische Bild auszulösen. Hierin könnte auch die Erklärung dafür liegen, dass gleiche oder sehr ähnliche Mutationen im SCN1A-Gen bei verschiedenen Menschen zur Manifestation unterschiedlicher Epilepsiesyndrome führen (Escayg et al.,

2001; Wallace et al., 2003; Fukuma et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Scheffer und Berkovic (Scheffer et al., 2001; Scheffer & Berkovic, 2003) stellen in diesem Zusammenhang die Vermutung an, dass es sich bei den modifizierenden genetischen Merkmalen vielleicht weniger um Mutationen als um Polymorphismen im Sinne von mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent vorkommenden Abweichungen vom Wildtyp handeln könnte, vermutlich auch im Bereich der regulatorischen Sequenzabschnitte.

Große Kollektive sind Bedingung, um das Wissen um die Korrelation zwischen zugrunde liegenden Mutationen und Erkrankungsmanifestation und -verlauf zu erweitern. Hierbei ist das eventuell differierende Ansprechen auf verschiedene Therapiestrategien ein sehr interessanter Gesichtspunkt. Die meisten antikonvulsiv wirksamen Medikamente wirken auf zentrale Ionenkanäle, so dass bei Menschen mit nachgewiesener Mutation ein gen- und mutationsspezifisches Wirkprofil, wenn auch zur Zeit noch visionär, so doch in Zukunft theoretisch möglich erscheint.

Weiterer Klärung bedarf auch die Tatsache, dass jüngst Mutationen im SCN1A-Gen bei einem Patienten mit einem völlig anderen Epilepsiesyndrom, dem West-Syndrom, gefunden wurden (Wallace et al., 2003). Die Heterogenität der durch Mutationen in ein und demselben Ionenkanal hervorgerufenen Epilepsien scheint also zumindest im Einzelfall noch weiter zu gehen als bislang auf Grund der Kenntnisse über GEFS+ und frühkindliche myoklonische Epilepsien angenommen. Eine weitere noch nicht ausreichend zu erklärende Konstellation wurde in einer von Nabbout und Mitarbeitern (2003a) untersuchten Familie gefunden, in der die an einer milde verlaufenden fokalen Epilepsie erkrankte Mutter einer SMEI-Patientin die gleiche SCN1A-Mutation wie diese trägt.

Zur Steigerung der Arbeitseffizienz haben wir daher begonnen, die von vielen internationalen Arbeitsgruppen bereits eingesetzten DHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography) zu etablieren; dieses gilt als Verfahren zum Mutationsscreening mit geringerem Zeit- und finanziellem Aufwand, aber auch auf maximal 90 % reduzierter Sensitivität.

6 Zusammenfassung

Die myoklonisch-astatische Epilepsie, die schwere myoklonische Epilepsie des Kindesalters und die frühkindliche Grand mal-Epilepsie mit alternierendem Hemi-Grand mal gehören zu den frühkindlichen myoklonischen Epilepsien. Alle drei Syndrome sind genetisch determinierte idiopathische generalisierte Epilepsien.

In Großfamilien mit gehäuft auftretenden generalisierten Epilepsien (sog. GEFS+-Syndrom) wurden ursächliche Mutationen in den Genen von vier Ionenkanälen (SCN1A, SCN1B, SCN2A, GABRG2) nachgewiesen. Mehrere der Mutationsträger litten an einer der drei Formen der frühkindlichen myoklonischen Epilepsien. In Folgeuntersuchungen wurden auch bei Patienten mit sporadisch auftretender schwerer myoklonischer Epilepsie des Kindesalters und frühkindlicher Grand mal-Epilepsie mit alternierendem Hemi-Grand mal Mutationen insbesondere im SCN1A-Gen, einem Natriumkanalgen, nachgewiesen. Die sporadische myoklonisch-astatische Epilepsie war zeitgleich zum experimentellen Teil unserer Arbeit Gegenstand zweier Studien anderer Arbeitsgruppen, die keine Mutation im SCN1A-Gen nachweisen konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kollektiv von Patienten mit myoklonisch-astatischer Epilepsie auf Mutationen im Gen des Natriumionenkanals SCN1A untersucht. Zwölf dieser Patienten hatte Prof. H. Doose in den 1970er Jahren zur Erstbeschreibung dieses Epilepsiesyndroms herangezogen. In die Studie wurden neben 21 Patienten mit myoklonisch-astatischer Epilepsie 17 Patienten mit frühkindlicher Grand mal-Epilepsie mit alternierendem Hemi-Grand mal, zwei mit einer schweren myoklonischen Epilepsie des Kindesalters und zehn mit noch nicht näher klassifizierbaren frühkindlichen myoklonischen Epilepsie eingeschlossen. Es wurden die 26 Exons des SCN1A-Gens sowie die angrenzenden intronischen Bereiche mittels DNA-Sequenzierung analysiert.

Es konnten dabei drei bislang nicht beschriebene Mutationen und ein neuer Polymorphismus im SCN1A-Gen nachgewiesen werden. Die erste Mutation betrifft eine Patientin, deren klinischer Phänotyp zwischen myoklonisch-astatischer Epilepsie und schwerer myoklonischer Epilepsie des Kindesalters liegt. Es handelt sich um eine Ein-Basen-Insertion in Exon 9, die zur Bildung eines vorzeitigen Stopp-Codons innerhalb des selben Exons und damit zur Translation in ein trunkiertes und somit funktionsge-

störtes Kanalprotein führt (c.1299insC>L434fsX449). Die zweite Mutation - Austausch einer Base im Bereich der Splice-Donor-Site des Exon 18 (IVS18+5G>C) - fand sich bei einer Patientin mit schwerer myoklonischer Epilepsie des Kindesalters. Auch hieraus resultiert mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit durch Verschiebung des Leserasters ein vorzeitiges Stopp-Codon. Bei dem dritten Patienten handelt es sich um einen Jungen mit einer schwer verlaufenden frühkindlichen Grand mal-Epilepsie mit alternierendem Hemi-Grand mal. Hier wird durch eine Punktmutation eine einzelne Aminosäure in der hoch konservierten porenbildenden Schleife zwischen Segment 5 und 6 der zweiten Domäne des Kanalproteins (DIIS5-S6-linker) ausgetauscht (c.2824C>A→R936S).

Es konnte somit gezeigt werden, dass auch bei sporadischer myoklonisch-astatischer Epilepsie Mutationen im SCN1A-Gen vorkommen, wohl aber eine deutlich geringere Rolle spielen als bei der schweren myoklonischen Epilepsie, bei der Mutationen in etwa 60 % nachweisbar sind. Für die frühkindliche Grand mal-Epilepsie mit alternierendem Hemi-Grand mal scheinen in unserem europäischen Kollektiv Mutationen in diesem Gen wenig relevant zu sein. In der Zusammenschau der der Literatur entnommenen und der neu hinzugewonnenen Daten lassen sich einige klinische Kriterien erkennen, die Hinweis auf das Vorliegen einer SCN1A-Mutation geben. Prädiktiv für Mutationen im SCN1A-Gen sind der Beginn der Erkrankung bei bis dahin unauffälligen Kindern im ersten Lebensjahr, die Entwicklung mentaler Behinderungen und ataktischer Bewegungsstörungen im Verlauf und die Persistenz der Anfälle trotz adäquater Therapie. Die von uns besonders beachteten myoklonisch-astatischen Anfälle scheinen mit Mutationen im SCN1A-Gen nicht deutlich assoziiert zu sein.

Als Fortführung der vorgelegten Arbeit wäre die Untersuchung der Promotorregion des SCN1A-Gens bei allen Patienten ohne Mutationsnachweis sinnvoll. Parallel hierzu sollten andere im ZNS exprimierte Natriumkanäle (SCN2A, SCN1B, SCN3A, SCN8A, SCN2B, SCN3B) in die Analyse einbezogen werden. Langfristig besteht so die Hoffnung, durch das Verständnis der Pathogenese auf der Ebene der mutationsbedingt veränderten Kanalproteine neue pharmakologische Therapieansätze entwickeln zu können.

7 Summary

The myoclonic astatic epilepsy, the severe myoclonic epilepsy in infancy, and the severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic clonic seizures belong to the myoclonic epilepsies of early childhood, a subgroup of the genetically determined idiopathic generalized epilepsies.

In extended families with frequent occurrence of generalized epilepsies (GEFS+) causal mutations in the genes of four ion channels (SCN1A, SCN1B, SCN2A, GABRG2) have been found. Some of the afflicted members suffer from a myoclonic epilepsy of early childhood. In succeeding studies mutations of these genes were detected in patients with sporadic severe myoclonic epilepsy in infancy and severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic clonic seizures, especially in SCN1A, a sodium channel. Recently, sporadic myoclonic astatic epilepsy was the subject of two studies by other research groups, in which no mutations could be found in this gene.

Almost at the same time we examined a group of patients with myoclonic astatic epilepsy to see, if mutations in the gene coding for the sodium channel SCN1A could be found. In this study we included 21 persons with this kind of epilepsy (12 of them belong to the group of children H. Doose used for the definition of this syndrome), 17 patients with severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic clonic seizures, two girls with severe myoclonic epilepsy in infancy, and ten children with myoclonic epilepsy of early childhood not definitely classified yet. The 26 exons and the adjacent intronic segments were analysed per DNA sequencing.

We could show three mutations and one polymorphism, which were unknown up to now. The first mutation affects a patient with a clinical phenotype between myoclonic astatic epilepsy and severe myoclonic epilepsy in infancy. It is a 1-base-insertion in exon 9, which causes a stopp codon within the same exon and consequently the synthesis of a truncated and dysfunctional channel protein (c.1299insC>L434fsX449). The second mutation (change of one base in the splice donor site of exon 18 [IVS18+5G>C]) was found in a patient with severe myoclonic epilepsy in infancy. It is most likely that in this case a frameshift and thereby a premature stopp codon results, too. The third patient suffers from idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic clonic seizures. One aminoacid in the high conserved pore re-

gion of the channel (the linker between the fifth and sixth segment of the second domain of the channel protein – DIIS5-S6-linker) is changed by a 1-base-missense-mutation (c.2824C>A →R936S).

So, it could be shown, that mutations of SCN1A exist in connection with the myoclonic astatic epilepsy. Obviously they don't play such an important part as in the severe myoclonic epilepsy in infancy, where mutations of this gene are the cause in about 60 %. With regard to idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic clonic seizures in our European collective SCN1A mutations hardly seem to be relevant. Considering the published and the newly added data, several clinical criteria are recognizable, which point to a SCN1A mutation. An uneventful history until first seizures, a subsequent development of mental retardation and ataxia, and a lack of seizure control despite an adequate therapy are predictive for a mutation of the SCN1A gene. The occurrence of myoclonic astatic seizures, which were the focus of our study, seems to be less typical than temperature sensitive and lateralized seizures.

In continuation of this study the examination of the promotor region of the SCN1A gene in all patients without positive detection of mutation would be useful. In addition, the analysis of the genes of other ion channels, that are exprimed in the brain (SCN2A, SCN1B, SCN3A, SCN8A, SCN2B, SCN3B), should be included in the analysis. On a long-term basis, there is hope that progress in the pharmacological treatment will result on the understanding of the pathogenesis at the level of alterations of the ion channels caused by mutation.

8 Literaturverzeichnis

1. Abou-Khalil B, Ge Q, Desai R, Ryther R, Bazyk A, Bailey R, Haines JL, Sutcliffe JS, George AL (2001) Partial and generalized epilepsy with febrile seizures plus and a novel SCN1A mutation. *Neurology* 57:2265-2272
2. Aicardi J (1994) Epilepsy in children. (2nd edition) (pp72-79) Raven Press, New York
3. Aicardi J, Chevrie JJ (1971) Myoclonic epilepsies of childhood. *Neuropädiatrie* 3(2):177-190
4. Alekov AK, Rahman M, Mitrovic N, Lehmann-Horn F, Lerche H (2000) A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro. *Journal of Physiology* 529(3):533-539
5. Alekov AK, Rahman M, Mitrovic N, Lehmann-Horn F, Lerche H (2001) Enhanced inactivation and acceleration of activation of the sodium channel associated with epilepsy in man. *European Journal of Neuroscience* 13:2171-2176
6. Annesi G, Gambardella A, Carrideo S, Incorpora G, Labate A, Pasqua AA, Civitelli D, Polizzi A, Annesi F, Spadafora P, Tarantino P, Candiano ICC, Romeo N, De Marco EV, Ventura P, LePiane E, Zappia M, Aguglia U, Pavone L, Quattrone A (2003) Two novel SCN1A missense mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Epilepsia* 44(9):1257-1258
7. Arima M, Ise Y, Ohta Y, Morio K (1960) Genetics of febrile convulsions. *Journal of Pediatric Practice* 23:1969-1974
8. Audenaert D, Claes L, Ceulemans B, Lofgren A, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2003) A deletion in SCN1B is associated with febrile seizures and early-onset absence epilepsy. *Neurology* 61(6):854-856

9. Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, Rosenberg-Bourgin M, Prud'homme J-F, Baulac M, Brice A, LeGuern E (1999) A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2q21-q33. *American Journal of Human Genetics* 65:1078-1085
10. Baulac S, Huberfeld G, Gournfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme J-F, Baulac M, Brice A, Bruzzone R, LeGuern E (2001) First genetic evidence of GABA_A receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the γ 2-subunit gene. *Nature Genetics* 28:46-48
11. Bendahhou S, Cummin TR, Tawil R, Waxman SG, Ptacek HJ (1999) Activation and inactivation of the voltage gated sodium channel : role of segment S5 revealed by a novel hyperkalemic periodic paralysis mutation. *Journal of Neurosciences* 19(12):4762-4771
12. Benlounis A, Nabbout R, Feingold J, Parmeggiani A, Guerrini R, Kaminska A, Dulac O (2001) Genetic predisposition to severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* 42(2):204-209
13. Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL (1998) Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Annals of Neurology* 43(4):435-445
14. Biervert C, Steinlein OK (1999) Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Human Genetics* 104:234-240
15. Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279:403-406
16. Bonanni P, Malcarne M, Moro F, Veggiotti P, Buti D, Ferrari AR, Parrini E, Mei D, Volzone A, Zara F, Heron SE, Bordo L, Marini C, Guerrini R (2004) Generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+): Clinical spectrum in seven Italian fami-

- lies unrelated to SCN1A, SCN1B, and GABRG2 gene mutations. *Epilepsia* 45(2):149-158
17. Bonanni P, Parmeggiani L, Guerrini R (2002) Different neurophysiologic patterns of myoclonus characterize Lennox-Gastaut syndrome and myoclonic-astatic epilepsy. *Epilepsia* 43(6):609-615
18. Briellmann RS, Torn-Broers Y, Berkovic SF (2001) Idiopathic generalized epilepsies: do sporadic and familial cases differ? *Epilepsia* 42(11):1399-1402
19. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S (1991) Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *Journal of Molecular Biology* 220:49-65
20. Ceulemans BP, Claes LR, Lagae LG (2004) Clinical correlations of mutations in the SCN1A gene: from febrile seizures to severe myoclonic epilepsy in infancy. *Pediatric Neurology* 30 (4):236-243
21. Chang BS, Lowenstein DH (2003) Mechanism of Disease: epilepsy. *New England Journal of Medicine* 349:1257-1266
22. Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M (1998) A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nature Genetics* 18:53-55
23. Chen Y, Lu J, Pan H, Zhang Y, Wu H, Zu K, Liu X, Yiang Y, Bao X, Yao Z, Ding K, Lo WH, Qiang B, Chan P, Shen Y, Wu X (2003) Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Annals of Neurology* 54:239-243
24. Claes L, Ceulemans B, Audenaert D, Smets K, Löfgren A, Del-Favero J, Ala-Mello S, Basel-Vanagaite L, Plecko B, Raskin S, Thiry P, Wolf NI, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2003) De novo SCN1A mutations are a major cause of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Human Mutation* 21:615-621

25. Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B, Lagae L, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2001) De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *American Journal of Human Genetics* 68:1327-1332
26. Commission on classification and terminology of the International League Against Epilepsy (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30:389-399
27. Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, Saint-Hilaire JM, Carmant L, Verner A, Lu WY, Wang YT, Rouleau GA (2002) Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetics* 31:184-189
28. De Fusco M, Becchetti A, Patrignani A, Annesi G, Gambardella A, Quartrone A, Ballabio A, Wanke E, Casari G (2000) The nicotinic receptor $\beta 2$ subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genetics* 26:275-276
29. Dose H (1992a) Pathogenese der Epilepsien im Kindes- und Jugendalter. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 140:385-390
30. Dose H. (1992b) Myoclonic astatic epilepsy of early childhood. In: Roger J, Bureau M, Dravet C, Dreifuss FE, Perret A, Wolf P (Eds.): *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence* (2nd edition) (pp. 103-114). John Libbey & Company Ltd., London
31. Dose H (1995) Epilepsien im Kindes- und Jugendalter. *Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg*
32. Dose H (2002) Das EEG bei Epilepsien im Kindes- und Jugendalter. *Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg*
33. Dose H, Baier WK (1987) Epilepsy with primarily generalized myoclonic-astatic seizures: a genetically determined disease. *European Journal of Pediatrics* 146:550-554

34. Doose H, Castiglione E, Waltz S (1995) Parental generalized EEG alpha activity predisposes to spike wave discharges in offspring. *Human genetics* 96(6):695-704
35. Doose H, Gerken H, Leonhardt R, Völzke E, Völz C (1970) Centrencephalic myoclonic-astatic petit mal. *Neuropädiatrie* 2(1):59-78
36. Doose H, Lunau H, Castiglione E, Waltz S (1998) Severe idiopathic generalized epilepsy of infancy with generalized tonic-clonic seizures. *Neuropediatrics* 29:229-238
37. Dravet C (1978) Les epilepsies graves de l'enfant. *Vie Medicale* 8:543-548
38. Dravet C, Bureau M, Guerrini R, Giraud N, Roger J. (1992) Severe myoclonic epilepsy in infants. In: Roger J, Bureau M, Dravet C, Dreifuss FE, Perret A, Wolf P (Eds.): *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence* (2nd edition) (pp. 75-88). John Libbey & Company Ltd., London
39. Durner M, Keddache MA, Tomasini L, Shinnar S, Resor SR, Cohen J, Harden C, Moshe SL, Rosenbaum D, Kang H, Ballaban-Gil K, Hertz S, Labar DR, Luciano D, Wallace S, Yohai D, Klotz I, Dicker E, Greenberg DA (2001) Genome scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type. *Annals of Neurology* 49:328-335
40. Engel J (2001) A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia* 42(6):796-803
41. Escayg A, De Waard M, Lee DD, Bichet D, Wolf P, Mayer T, Johnston J, Baloh R, Sander T, Meisler MH (2000a) Coding and noncoding variation of the human calcium-channel β_4 -subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *American Journal of Human Genetics* 66:1531-1539
42. Escayg A, Heils A, MacDonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH (2001) A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus –

- and prevalence of variants in patients with epilepsy. *American Journal of Human Genetics* 68:866-873
43. Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A (2000b) Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nature Genetics* 24:343-345
44. Frantzen E, Lennox-Buchthal M, Nygaard A, Stene J (1970) A genetic study of febrile convulsions. *Neurology* 20:909-917
45. Fujiwara T, Nakamura H, Watanabe M, Yagi K, Seino M, Nakamura H (1990) Clinico-electrographic concordance between monozygotic twins with SMEI. *Epilepsia* 31(3):281-286
46. Fujiwara T, Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Takahashi Y, Fukushima K, Watanabe M, Hara K, Morikawa T, Yagi K, Yamakawa K, Inoue Y (2003) Mutations of sodium channel α subunit type 1 (SCN1A) in intractable childhood epilepsies with frequent generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 126:531-546
47. Fukuda M, Morimoto T, Nagao H, Kida K (1997) Clinical study of epilepsy with severe febrile seizures and seizures induced by hot water bath. *Brain & Development* 19(3):212-216
48. Fukuma G, Oguni H, Shirasaka Y, Watanabe K, Miyajima T, Yasumoto S, Ohfu M, Inoue T, Watanachai A, Kira R, Matsuo M, Muranaka H, Sofue F, Zhang B, Kaneko S, Mitsudome A, Hirose S (2004) Mutations of neuronal voltage-gated Na⁺ channel α 1 subunit gene SCN1A in core severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) and in Borderline SMEI (SMEB). *Epilepsia* 45(2):140-148
49. Fukuyama Y, Kagawa K, Tanaka K (1979) A genetic study of febrile convulsions. *European Neurology* 18:166-182

50. Gennaro E, Veggotti P, Malacarne M, Madia F, Cecconi M, Cardinali S, Cassetti A, Cecconi I, Bertini E, Bianchi A, Gobbi G, Zara F (2003) Familial severe myclonic epilepsy of infancy: truncation of Nav1.1 and genetic heterogeneity. *Epileptic Disorder* 5(1):21-25
51. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28:365-368
52. Harkin LA, Bowser DN, Dibbens LM, Singh R, Phillips F, Wallace RH, Richards MC, Williams DA, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE, Petrou S (2002) Truncation of the GABA_A-receptor $\gamma 2$ subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *American Journal of Human Genetics* 70:530-536
53. Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, Sander T, Ramírez A, Poser B, Maljevic S, Hebeisen S, Kubisch C, Rebstock J, Horvath S, Hallmann K, Dullinger JS, Rau B, Haverkamp F, Beyenburg S, Schulz H, Janz D, Giese B, Müller-Newen G, Propping P, Elger CE, Fahlke C, Lerche H, Heils A (2003) Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nature Genetics* 33(4):527-532
54. Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA (1996) Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clinic Proceedings* 71:576-586
55. Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouze P, Brunak S (1996) Splice site prediction in Arabidopsis thaliana DNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Resarch* 24(17):3439-3452
56. Hedera P, Abou-Khalil B, Crunk AE, Taylor KA, Haines JL, Sutcliffe JS (2004) Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: two families with novel mutations in the LGI1 gene. *Epilepsia* 45(3):218-222

57. Heron SE, Crossland KM, Andermann E, Phillips HA, Hall AJ, Bleasel A, Shevell M, Mercho S, Seni M-H, Guiot M-C, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE (2002) Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* 360:851-852
58. Hirose S, Iwata H, Akiyoshi H, Kobayashi K, Ito M, Wada K, Kaneko S, Mitsudome A (1999) A novel mutation of CHRNA4 responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology* 53:1749-1753
59. Hirose S, Zenri F, Akiyoshi H, Fukuma G, Iwata H, Inoue T, Yonetani M, Tsutsumi M, Muranaka H, Kurokawa T, Hanai T, Wada K, Kaneko S, Mitsudome A (2000) A novel mutation of KCNQ3 (c.925T→C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions. *Annals of Neurology* 47:822-826
60. Hurst DL (1990) Epidemiology of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia* 31(4):397-400
61. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Boneschi FM, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitzskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann AH, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R, Gilliam TC (2002) Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nature Genetics* 30:335-341
62. Kaminska A, Ickowicz A, Plouin P, Bru MF, Dellatolas G, Dulac O (1999) Delineation of cryptogenic Lennox-Gastaut syndrome and myoclonic astatic epilepsy using multiple correspondence analysis. *Epilepsy Research* 36:15-29
63. Kamiya K, Kaneda M, Sugawara T, Mazaki E, Okamura N, Montal M, Makita N, Tanaka M, Fukushima K, Fujiwara T, Inoue Y, Yamakawa K (2004) A nonsense mutation of the sodium channel gene SCN2A in a patient with intractable epilepsy and mental decline. *Neurosciences* 24(11):2690-2698

64. Kananura C, Haug K, Sander T; Runge U, Gu W, Hallmann K, Rebstock J, Heils A, Steinlein OK (2002) A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy. *Archives of Neurology* 59(7):1137-1141
65. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleepe R, Molineux I, Khorana HG (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases *Journal of Molecular Biology* 56(2):341-361
66. Köhling R (2002) Voltage-gated sodium channels in epilepsy. *Epilepsia* 43(11):1278-1295
67. Kullmann DM (2002) The neuronal channelopathies. *Brain* 125:1177-1195
68. Lagenstein I (1981) Epilepsien mit myoklonisch-astatischen Anfällen. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 129(3):145-153
69. Leppert M, Anderson VE, Quattlebaum T, Stauffer D, O'Connell P, Nakamura Y, Lalouel J-M, White R (1989) Benign familial neonatal convulsions linked to genetic markers on chromosome 20. *Nature* 337:647-648
70. Lerche H, Biervert C, Alekov AK, Schleithoff L, Lindner M, Klingler W, Bretschneider F, Mitrovic N, Jurkat-Rott K, Bode H, Lehmann-Horn F, Steinlein OK (1999) A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Annals of Neurology* 46:305-312
71. Lerche H, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2001a) Ion channels and epilepsy. *American Journal of Medical Genetics* 106:146-159
72. Lerche H, Weber YG, Baier H, Jurkat-Rott K, Kraus de Camargo O, Ludolph AC, Bode H, Lehmann-Horn F (2001b) Generalized epilepsy with febrile seizures plus: further heterogeneity in a large family. *Neurology* 57:1191-1198

73. Lewis TB, Leach RJ, Ward K, O'Connell P, Ryan SG (1993) Genetic heterogeneity in benign familial neonatal convulsions: identification of a new locus on chromosome 8q. *American Journal of Human Genetics* 53:670-675
74. Lopes-Cendes I, Scheffer IE, Berkovic SF, Rousseau M, Andermann E, Rouleau GA (2000) A new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus maps to chromosome 2. *American Journal of Human Genetics* 66:698-701
75. Lossin C, Rhodes TH, Desai RR, Vanoye CG, Wang D, Carniciu S, Devinsky O, George AL (2003) Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel SCN1A. *Journal of Neurosciences* 23(36):11289-11295
76. Lossin C, Wang DW, Rhodes TH, Vanoye CG, George AL (2002) Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* 34:877-884
77. Madia F, Gennaro E, Cecconi M, Buti D, Capovilla G, Dalla Bernardina B, Elia M, Ferrari A, Fontana E, Gaggero R, Giannotta M, Giordano L, Granata T, La Selva L, Luisa Lispi M, Santucci M, Vanadia F, Veggiotti P, Vigliano P, Viri M, Dagna Briccarelli F, Bianchi A, Zara F (2003) No evidence of GABRG2 mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsy Research* 53(3):196-200
78. Marini C, Harkin LA, Wallace RH, Mulley, JC, Scheffer, IE, Berkovic, SF (2003) Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with a GABA_A receptor mutation. *Brain* 126:230-240
79. Meisler MH, Kearney J, Ottman R, Escayg A (2001) Identification of epilepsy genes in human and mouse. *Annual Review of Genetics* 35:567-588
80. Miraglia del Giudice E, Coppola G, Succimarra G, Cirillo G, Bellini G, Pascotto A (2000) Benign familial neonatal convulsions (BFNC) resulting from mutation of the KCNQ2 voltage sensor. *European Journal of Human Genetics* 8:994-997
81. Moulard B, Guipponi M, Chaigne D, Mouthon D, Buresi C, Malafosse A (1999) Identification of a new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus

- (GEFS+) on chromosome 2q24-33. *American Journal of Human Genetics* 65:1396-1400
82. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symposium of Quantitative Biology* 51(1):263-273
83. Nabbout R, Gennaro R, Dalla Bernardina B, Dulac O, Madia F, Bertini E, Capovilla G, Chiron C, Cristofori G, Elia M, Fontana E, Gaggero R, Granata T, Guerrini R, Loi M, La Selva L, Lispi ML, Matricardi A, Romeo A, Tzolas V, Valseriati D, Veggiotti P, Vigevano F, Vallée L, Dagna Bricarelli F, Bianchi A, Zara F (2003a) Spectrum of SCN1A mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology* 60:1961-1967
84. Nabbout R, Kozlovski A, Gennaro E, Bahi-Buisson N, Zara F, Chiron C, Bianchi A, Brice A, Leguern E, Dulac O (2003b) Absence of mutations in major GEFS+ genes in myoclonic astatic epilepsy. *Epilepsy Research* 56:127-133
85. Nakayama J, Yamamoto N, Hamano K, Iwasaki N, Ohta M, Nakahara S, Horigome Y, Nakahara C, Noguchi E, Shiono J, Shimakura Y, Yamakawa-Kobayashi K, Matsui A, Arinami T (2002a) Failure to find evidence for association between voltage-gated sodium channel gene SCN2A variants and febrile seizures in humans. *Neuroscience Letters* 329(2):249-251
86. Nakayama J, Fu YH, Clark AM, Nakahara S, Hamano K, Iwasaki N, Matsui A, Arinami T, Ptacek LJ (2002b) A nonsense mutation of the MASS1 gene in a family with febrile and afebrile seizures. *Annals of Neurology* 52:654-657
87. Neubauer BA, Sander T (2001) Idiopathische Epilepsien mit komplexem Vererbungsmuster. *Zeitschrift für Epileptologie* 14(3):109-114
88. Noebels JL (2003) Exploring new gene discoveries in idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 44(S2):16-21

89. Oguni H, Fukuyama Y, Tanaka T, Hayashi K, Funatsuka M, Sakauchi M, Shirakawa S, Osawa M (2001a) Myoclonic-astatic epilepsy of early childhood – clinical and EEG analysis of myoclonic-astatic seizures, and discussions on the nosology of the syndrome. *Brain & Development* 23:757-764
90. Oguni H, Hayashi K, Awaya Y, Fukuyama Y, Osawa M (2001b) Severe myoclonic epilepsy in infants – a review based on the Tokyo Women’s Medical University series of 84 cases. *Brain & Development* 23:736-748
91. Oguni H, Tanaka T, Hayashi K, Funatsuka M, Sakauchi M, Shirakawa S, Osawa M (2002) Treatment and long-term prognosis of myoclonic-astatic epilepsy of early childhood. *Neuropediatrics* 33:122-132
92. Ohmori I, Ohtsuka Y, Ouchida M, Ogino T, Maniwa S, Shimizu K, Oka E (2003) Is phenotype difference in severe myoclonic epilepsy in infancy related to SCN1A mutations? *Brain & Development* 27:488-493
93. Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y, Oka E, Shimizu K (2002) Significant correlation of the SCN1A mutations and severe myoclonic epilepsy in infancy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295(1):17-23
94. Phillips HA, Favre I, Kirkpatrick M, Zuberi SM, Goudie D, Heron SE, Scheffer IE, Sutherland GR, Berkovic SF, Bertrand D, Mulley JC (2001) CHRNA2 is the second acetylcholine receptor subunit associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *American Journal of Human Genetics* 68:225-231
95. Phillips HA, Marini C, Scheffer IE, Sutherland GR, Mulley JC, Berkovic SF (2000) A de novo mutation in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy. *Annals of Neurology* 48:264-267
96. Phillips HA, Scheffer IE, Berkovic SF, Hollway GE, Sutherland GR, Mulley JC (1995) Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 20q13.2. *Nature genetics* 10:117-118

97. Racacho LJ, McLachlan RS, Ebers GC, Maher J, Bulman DE (2000) Evidence favoring genetic heterogeneity for febrile convulsions. *Epilepsia* 41(2):132-139
98. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D (1997) Improved splice site detection in genie. *Journal of Comparative Biology* 4(3):311-323
99. Rich SS, Annegers JF, Hauser WA, Anderson VE (1987) Complex segregation analysis of febrile convulsions. *American Journal of Human Genetics* 41(2):249-257
100. Robinson R, Gardiner M (2000) Genetics of childhood epilepsy. *Archives of Disease in childhood* 82:121-125
101. Rozycka A, Skorupska E, Kostyrko A, Trzeciak WH (2003) Evidence for S284L mutation of the CHRNA4 in a white family with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsia* 44(8):1113-1117
102. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 74(12):5463-5467
103. Scheffer IE, Berkovic SF (1997) Generalized epilepsy with febrile seizures plus – a genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain* 120:479-490
104. Scheffer IE, Berkovic SF (2003) The genetics of human epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences* 24(8):428-433
105. Scheffer IE, Wallace R, Mulley JC, Berkovic SF (2001) Clinical and molecular genetics of myoclonic-astatic epilepsy and severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome). *Brain & Development* 23:732-735
106. Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer

- A, Anderson VE, Leppert M (1998) A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genetics* 18(1):25-29
107. Singh R, Andermann E, Whitehouse WPA, Harvey AS, Keene DL, Seni M-H, Crossland KM, Andermann F, Berkovic SF, Scheffer IE (2001) Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS⁺?. *Epilepsia* 42(7):837-844
108. Singh R, Scheffer IE, Crossland K, Berkovic SF (1999a) Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a common childhood-onset genetic epilepsy syndrome. *Annals of Neurology* 45:75-81
109. Singh R, Scheffer IE, Whitehouse W, Harvey AS, Crossland KM, Berkovic SF (1999b) Severe myoclonic epilepsy in infancy is part of the spectrum of generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+). *Epilepsia* 40(S2):175
110. Spanpanato J, Aradi I, Soltesz I, Goldin AL (2003a) Increased neuronal firing in computer simulations of sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Journal of Neurophysiology* (in press)
111. Spanpanato J, Escayg A, Meisler MH, Goldin AL (2003b) Generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2 mutation W1204R alters voltage-dependent gating of Na_v1.1 sodium channels. *Neuroscience* 116(1):37-48
112. Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF (1995) A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor α 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genetics* 11:201-203
113. Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Fukushima K, Shimomura J, Fujiwara T, Hamano S, Inoue Y, Yamakawa K (2002) Frequent mutations of SCN1A in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Neurology* 58:1122-1124

114. Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Ito M, Nagafuji H, Fukuma G, Mitsudome A, Wada K, Kaneko S, Hirose S, Yamakawa K (2001a) Na_v1.1 mutations cause febrile seizures associated with afebrile partial seizures. *Neurology* 57:703-705
115. Sugawara T, Tsurubuchi Y, Agarwala KL, Ito M, Fukuma G, Mazaki-Miyazaki E, Nagafuji H, Noda M, Imoto K, Wada K, Mitsudome A, Kaneko S, Montal M, Nagata K, Hirose S, Yamakawa K (2001b) A missense mutation of the Na⁺ channel α_{II} subunit gene Na_v1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98(11):6384-6389
116. Tsuboi T (1985) Die Genetik der Epilepsien. In: Hallen O, Meyer-Wahl JG, Brau J (Hrsg.): *Epilepsie* 83. (S. 11-81). Einhorn-Press, Reinbeck
117. Wallace RH, Hodgson BL, Grinton BE, Gardiner RM, Robinson R, Rodriguez-Casero V, Sadleir L, Morgan J, Harkin LA, Dibbens LM, Yamamoto T, Andermann E, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE (2003) Sodium channel $\alpha 1$ -subunit mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy and infantile spasms. *Neurology* 61:765-769
118. Wallace RH, Marini C, Petrou S, Harkin LA, Bowser DN, Panchal RG, Williams DA, Sutherland, GR, Mulley JC, Scheffer IE, Berkovic SF (2001a) Mutant GABA_A receptor $\gamma 2$ -subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nature Genetics* 28:49-52
119. Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Leman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B, Goikhman I, Singh R, Kremmiodis G, Gardner A, Sutherland GR, George AL, Mulley JC, Berkovic SF (2001b) Neuronal sodium-channel $\alpha 1$ -subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *American Journal of Human Genetics* 68:859-865
120. Wallace RH, Scheffer IE, Parasivam G, Barnett S, Wallace GB, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC (2002) Generalized epilepsy with febrile seizures plus: mutation of the sodium channel subunit SCN1B. *Neurology* 58:1426-1429

121. Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC (1998) Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel β 1 subunit gene SCN1B. *Nature Genetics* 19:366-370
122. Watanabe M, Fujiwara T, Yagi K, Seino M, Higashi T (1989) Intractable childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures. *Journal of Japanese Epilepsy Society* 7:96-105
123. Weber P, Tillmann B, Minet J-C, Blauenstein U (2002) Myoklonisch-astatische Epilepsie des frühen Kindesalters: Übersicht über den aktuellen Kenntnisstand zu klinischen Befunden, EEG-Merkmalen, Ätiologie und Therapie. *Klinische Pädiatrie* 214:279-284

Anhang A Tabellen und Übersichten

Tabelle A1: Oligonukleotide (sog. Primer)

Name	Basensequenz in 5'→3'-Richtung	Schmelztemperatur (°C)
1f	TCATGGCACAGTTCCTGTATC	62,0
1r	GCAGTAGGCAATTAGCAGCAA	62,0
2f	TGGGGCACTTTAGAAATTGTG	60,0
2r	TGACAAAGATGCAAAATGAGAG	60,0
3f	GCAGTTTGGGCTTTTCAATG	58,0
3r	TGAGCATTGTCCTCTTGCTG	60,0
4f	AGGGCTACGTTTCATTTGTATG	62,0
4r	TGTGCTAAATTGGAATCCAGAG	62,0
5f	CAGCTCTTCGCACTTTCAGA	60,0
5r	TCAAGCAGAGAAGGATGCTGA	62,0
6f	AGCGTTGCAAACATTCTTGG	58,0
6r	GGGATATCCAGCCCCTCAAG	64,0
7f	GACAAATACTTGTGCCTTTGAATG	66,0
7r	ACATAATCTCATACTTTATCAAAAACC	68,0
8f	GAAATGGAGGTGTTGAAAATGC	62,0
8f2	TCTTTCTGACTAGGCAATATC	55,1
8r	AATCCTTGGCATCACTCTGC	60,0
9f	AGTACAGGGTGCTATGACCAAC	66,0
9f2	GCTAGACACATGAGTAAATTG	53,9
9r	TCCTCATACAACCACCTGCTC	64,0
9r2	GTCAGTGCCATGAGACAG	57,6
10f	TCTCCAAAAGCCTTCATTAGG	60,0
10f2	GAGAATCTTCTCTGTGAGATG	55,4
10f3	GATACAGTCTCTTCAGGTGC	56,3
10r	TTCTAATTCTCCCCCTCTCTCC	66,0
11f	TCCTCATTCTTTAATCCCAAGG	62,0
11r	GCCGTTCTGTAGAAACACTGG	64,0
12f	GTCAGAAATATCTGCCATCACC	64,0
12r	GAATGCACTATTCCCAACTCAC	64,0
13f	TGGGCTCTATGTGTGTGTCTG	64,0
13r	GGAAGCATGAAGGATGGTTG	60,0
13r2	CAAGCAGAAAATTTGAAGAC	56,5
14f	TACTTCGCGTTTCCACAAGG	60,0
14r	GCTATGCAGAACCCTGATTG	60,0
14r2	GCTATGCAAGAACCCTGATTG	62,0
15f	ATGAGCCTGAGACGGTTAGG	62,0
15r	ATACATGTGCCATGCTGGTG	60,0
16f	TGCTGTGGTGTTTCCTTCTC	60,0
16f2	GGTCCTGAATCTCTTTCTGG	60,2
16f3	AAACCACTTGATGATCTAAAC	54,7
16r	TGTATTCATACCTTCCCACACC	64,0
17f	AAAAGGGTTAGCACAGACAATG	62,0
17r	ATTGGGCAGATATAATCAAAGC	60,0
18f	CACACAGCTGATGAATGTGC	60,0
18r	TGAAGGGCTACACTTTCTGG	60,0

19f	TCTGCCCTCCTATTCCAATG	60,0
19r	GCCCTTGTCTTCCAGAAATG	60,0
20f	AAAAATTACATCCTTTACATCAAACG	68,0
20r	TTTTGCATGCATAGATTTTCC	56,0
21f	TGAACCTTGCTTTTACATATCC	60,0
21r	ACCCATCTGGGCTCATAAAC	60,0
22f	TGTCTTGGTCCAAAATCTGTG	60,0
22r	TTGGTCGTTTATGCTTTATTCCG	60,0
23f	CCCTAAAGGCCAATTTCAAG	60,0
23f2	ATGCTGACATATTAGTAAG	46,1
23r	ATTTGGCAGAGAAAACACTCC	60,0
24f	GAGATTTGGGGGTGTTTGTC	60,0
24r	GGATTGTAATGGGGTGCTTC	60,0
25f	CAAAAATCAGGGCCAATGAC	58,0
25r	TGATTGCTGGGATGATCTTG	58,0
26af	AGGACTCTGAACCTTACCTTGG	66,0
26ar	TGTACATGTTCAACACAACCAG	64,0
26bf	TGTGGGAACCCATCTGTTG	58,0
26br	CCATGAATCGCTCTTCCATC	60,0
26cf	TGCTTTTACAAAGCGGGTTC	58,0
26cr	GTTTGCTGACAAGGGGTCAC	62,0

Tabelle A2: Position, Häufigkeit und Art der bisher publizierten SCN1A-Mutationen bei SMEI, GEFS+ mit MAE/SMEI und FKGM (bzw. atyp. SMEI – Begriff von Autoren übernommen)

Kanalposition	Anzahl der Mutationen (Missense/Nonsense-Frameshift)	Kommentar zum Syndrom
N-terminal	8 (4/4)	1 x atyp. SMEI
DIS1	1 (0/1)	
DIS1-S2	1 (0/1)	
DIS2	1 (0/1)	
DIS2-3	3 (2/1)	1 x GEFS+ mit MAE
DIS3	1 (1/0)	
DIS4	3 (1/2)	
DIS5	1 (1/0)	
DIS5-6	8 (4/4)	1 x atyp. SMEI
DI-II	10 (1/9)	
DIIS2	1 (1/0)	FKGM
DIIS4-5	1 (0/1)	
DIIS5-6	13 (9/4)	4 x atyp. SMEI
DIIS6	4 (4/0)	2 x FKGM
DII-III	11 (2/9)	1 x FKGM ; 1 x GEFS+ mit SMEI und MAE
DIIS1	2 (2/0)	
DIIS1-2	2 (0/2)	
DIIS2	3 (2/1)	1 x atyp. SMEI
DIIS3	2 (0/2)	
DIIS4	1 (1/0)	
DIIS5	1 (1/0)	1 x atyp. SMEI
DIIS5-6	11 (5/6)	
DIII-IV	1 (0/1)	1 x FKGM* (Stopp-Codon)
DIVS3	2 (1/1)	1 x FKGM
DIVS3-4	1 (1/0)	
DIVS4	4 (3/1)	
DIVS4-5	3 (2/1)	
DIVS5	5 (4/1)	
DIVS5-6	2 (1/1)	1 x FKGM
DIVS6	6 (2/4)	1 x atyp. SMEI (Deletion 1 AS)
C-terminal	16 (6/10)	1 x FKGM ; 1 x GEFS+ mit SMEI

Sind identische Mutationen bei mehreren Personen nachgewiesen, werden sie hier nur einmal aufgeführt.

*einzige Mutationen außerhalb einer SMEI in dieser Tabelle, die keine Missense-Mutation darstellt.

Tabelle A3: PCR-Bedingungen

Exon	Exonlänge	Vordenaturierung	Zykluszahl	Denaturierung	Annealing	Elongation	finale Elong.	Zusatz
1	589 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	62 °C/30"	72 °C/60"	72 °C/7'	MgCl ₂
2	391 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/7'	Ø
3	314 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	58 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/7'	Ø
4	421 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	62 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	MgCl ₂
5	307 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/7'	MgCl ₂
6	477 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	54 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	MgCl ₂
7	362 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	58 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/7'	MgCl ₂
8	581 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	56 °C/45"	72 °C/60"	72 °C/7'	Ø
9	440 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	62 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	MgCl ₂
10	544 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/60"	72 °C/7'	MgCl ₂
11	670 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	61 °C/30"	72 °C/60"	72 °C/7'	MgCl ₂
12	372 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	58 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/7'	Ø
13	543 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	62 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	Ø
14	433 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	MgCl ₂
15	544 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	MgCl ₂
16	658 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/60"	72 °C/7'	MgCl ₂
17	489 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	62 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/7'	MgCl ₂
18	567 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	MgCl ₂
19	445 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	MgCl ₂
20	395 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	56 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/7'	MgCl ₂
21	579 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	MgCl ₂
22	283 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/7'	MgCl ₂
23	378 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	58 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/7'	MgCl ₂
24	600 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/60"	72 °C/7'	Ø
25	483 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	56 °C/30"	72 °C/45"	72 °C/7'	Ø
26a	589 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	60 °C/30"	72 °C/60"	72 °C/7'	Ø
26b	418 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	51 °C/45"	72 °C/15"	72 °C/7'	MgCl ₂
26b+c	592 bp	94 °C/5'	30	94 °C/30"	58 °C/30"	72 °C/60"	72 °C/7'	Ø

Tabelle A4: Häufigkeit von Mutationen im SCN1A-, SCN1B-, SCN2A-, GABRG2-Gen bei GEFS+, SMEI, MAE, FKGM (Literaturübersicht)

	SCN1A	SCN1B	SCN2A	GABRG2	keine Mutation
GEFS+	3/36 (Wallace et al., 2001b) 2/6 (Sugawara et al., 2002) 2/9 (Annesi et al., 2003) 1/226 Pat. mit IGE (Escayg et al., 2001) 5 Einzelfamilien (Escayg et al., 2000b, 2001; Abou-Khalil et al., 2001; Gennaro et al., 2003)	3/90 (Wallace et al., 1998, 2002; Audenaert et al., 2003)	1/19 (Sugawara et al., 2001b) 0/35 (Nakayama et al., 2002a)	1/>200 einzelnen IGE-Pat. (Harkin et al., 2002) 1/102 (Kanamura et al., 2002) 2 Einzelfamilien (Wallace et al., 2001a; Baulac et al., 2001)	7/7 (Bonnani et al., 2004)
SMEI	2 x in GEFS+ (Wallace et al., 2001b; Annesi et al., 2003) 7/7 (Claes et al., 2001) 9/9 (Claes et al., 2003) 23/25 (Fujiwara et al., 2003) 24/29 (Ohmori et al., 2002) 33/93 (Nabbout et al., 2003a) 10/14 (Sugawara et al., 2002) 8/24 (Wallace et al., 2003)	0/29 (Ohmori et al., 2002) 1 x in GEFS+ (Wallace et al., 2002)	0/29 (Ohmori et al., 2002) 1 Patient mit atypischer SMEI (Kamiya et al., 2004)	2 x in GEFS+ (Harkin et al., 2002; Wallace et al., 2001a) 0/53 (Madia et al., 2003)	
MAE	2 x in GEFS+ (Wallace et al., 2001b; Escayg et al., 2001)	1 x in GEFS+ (Wallace et al., 1998)	1 x in GEFS+ (Sugawara et al., 2001a)	2 x in GEFS+ (Wallace et al., 2001a; Harkin et al., 2002)	4/4 (Ohmori et al., 2002) 22/22 (Nabbout et al., 2003b)
FKGM	8/10 (Fujiwara et al., 2003)	bislang keine molekulargenetischen Untersuchungen veröffentlicht			

Tabelle A5: Mutationen im SCN1A-Gen bei frühkindlichen myoklonischen Epilepsien

Aminosäure (AF043484; nach Escayg et al., 2000b)	Autor	Exon	Base (von AC010127 abweichende Angaben unverändert übernommen)	Proteinposition	Kommentar
Q3X	Claes et al., 2003	1	c.7C>T	N-terminal	SMEIB
P37fsX91	Wallace et al., 2003	1	c.111delC	N-terminal	
E78D	Nabbout et al., 2003a	1	c.234G>T	N-terminal	
Y83X	Nabbout et al., 2003a	1	c.249C>G	N-terminal	
R101Q	Fukuma et al., 2004	2	c.302G>A	N-terminal	
S103G	Fujiwara et al., 2003	2	c.307A>G	N-terminal	
T112I	Fujiwara et al., 2003	2	c.335C>T	N-terminal	
S128X	Nabbout et al., 2003	2	c.383C>A	N-terminal	
V143fsX148	Fukuma et al., 2004	3	c.492-493delGT	DIS1	GEFS+ mit MAE (Originalfamilie)
Y165X	Nabbout et al., 2003a	4	c.495T>A	DIS2	
G177E	Nabbout et al., 2003a	4	c.530G>A	DIS2-S3-linker	
G177fsX180	Fujiwara et al., 2003	4	c.530delG	DIS2-S3-linker	
D188V	Wallace et al., 2001b	4	c.563A>T	DIS2-S3-linker	
W190R	Fukuma et al., 2004	4	c.568T>C	DIS3	
Splice site	Fujiwara et al., 2003	IVS4	IVS4+1G>A	DIS1-S2-linker	
F218fsX275	Claes et al., 2001	5	c.657-658delAG	DIS4	
R222X	Claes et al., 2001; Nabbout et al., 2003a (2 Pat.); Fukuma et al., 2004	5	c.664C>T	DIS4	

I227S	Nabbout et al., 2003a (3 x)	5	c.680T>G	DIS4	
G265W	Fujiwara et al., 2003	6	c.793G>T	DIS5	
W280R	Nabbout et al., 2003a	6	c.838T>C	DIS5-S6-linker	
A285fsX290	Nabbout et al., 2003a	6	c.853-856delCTTC	DIS5-S6-linker	
E289X	Nabbout et al., 2003a	6	c.865G>C	DIS5-S6-linker	matern. Vererbung
T297I	Nabbout et al., 2003a	6	c.890C>T	DIS5-S6-linker	matern. Vererbung
G343E	Fujiwara et al., 2003	8	c.1028G>A	DIS5-S6-linker	atypische SMEI
S374fsX378	Nabbout et al., 2003a	8	c.1121delC	DIS5-S6-pore	
Q389X	Nabbout et al., 2003a	8	c.1156C>T	DIS5-S6-linker	
R393H	Claes et al., 2003	9	c.1178G>A	DIS5-S6-linker	
Y426N	Nabbout et al., 2003a	9	c.1276T>A	DI-DII-linker	
E435X	Fukuma et al., 2004	9	c.1303G>T	DI-DII-linker	
I448X	Wallace et al., 2003	9	c.1342-1352delATTGAACAGCT	DI-DII-linker	
R501fsX543	Ohmori et al., 2002, 2003	10	c.1502delG	DI-DII-linker	
K547fsX570	Ohmori et al., 2002, 2003	10	c.1641-1642insA	DI-DII-linker	
R568X	Ohmori et al., 2002, 2003	11	c.1702 C>T	DI-DII-linker	
S607fsX622	Ohmori et al., 2002, 2003	11	c.1820delC	DI-DII-linker	
P707fsX714	Ohmori et al., 2002, 2003	12	c.2087delC	DI-DII-linker	
R712X	Fukuma et al., 2004; Ohmori et al., 2002, 2003; Sugawara et al., 2002	12	c.2101C>T	DI-DII-linker	
Q732fsX749	Fujiwara et al., 2003	13	c.2196-2197insCACCTGT	DI-DII-linker	

T808S	Fujiwara et al., 2003	14	c.2422A>T	DIIS2	FKGM (bei gleichem Pat. auch N1011I)
R865X	Ohmori et al., 2002, 2003; Escayg et al., 2000b	15	c.2560C>T; c.2624C>T	DIIS4-S5-linker	
F902C	Ohmori et al., 2002, 2003	15	c.2705T>G	DIIS5	
R931C	Ohmori et al., 2002, 2003 (2 x)	15	c.2761C>T	DIIS5-S6-linker	
W932X	Claes et al., 2003	15	c.2796G>A	DIIS5-S6-linker	
M934I	Fukuma et al., 2004	15	c.2772G>A	DIIS5-S6-linker	SMEIB
M934I	Fukuma et al., 2004	15	c.2772G>C	DIIS5-S6-linker	
H939Q	Claes et al., 2003	15	c.2817C>G	DIIS5-S6-linker	
V944A	Fukuma et al., 2004	15	c.2801T>C	DIIS5-S6-linker	SMEIB
R946C	Fukuma et al., 2004	15	c.2806C>T	DIIS5-S6-linker	auch SMEIB
R946H	Fukuma et al., 2004	15	c.2807G>A	DIIS5-S6-linker	SMEIB
R946fsX953	Fujiwara et al., 2003	15	c.2835delC	DIIS5-S6-linker	
W952X	Fukuma et al., 2004; Fujiwara et al., 2003	15	c.2825G>A; c.2855G>A	DIIS5-S6-linker	
D957fsX962	Sugawara et al., 2002	15	c.2841delC	DIIS5-S6-linker	
C959R	Claes et al., 2003	15	c.2875C>G	DIIS5-S6-linker	
M960V	Fujiwara et al., 2003	15	c.2878A>G	DIIS5-S6-linker	
G979R	Fujiwara et al., 2003	15	c.2935G>A	DIIS6	FKGM
V983A	Fujiwara et al., 2003	15	c.2948T>C	DIIS6	FKGM
N985I	Fujiwara et al., 2003	15	c.2954A>T	DIIS6	

L986F	Claes et al., 2001	16	c.2956C>T	DIIS6	
A1002fsX1009	Ohmori et al., 2002, 2003	16	c.2976delC	DII-DIII-linker	
N1011I	Fujiwara et al., 2003	16	c.3032A>T	DII-DIII-linker	FKGM (bei gleichem Pat. auch T808S)
K1027X	Ohmori et al., 2002, 2003	16	c.3049A>T	DII-DIII-linker	
H1065fsX1073	Nabbout et al., 2003a	16	c.3195-3196delTA	DII-DIII-linker	
T1082fsX1086	Ohmori et al., 2002, 2003	16	c.3215delC	DII-DIII-linker	
L1175fsX1182	Fukuma et al., 2004	17	c.3494-3495delTT	DII-DIII-linker	
F1189fsX1197	Claes et al., 2001	16	c.3299-3300insAA	DII-DIII-linker	
W1204R	Escayg et al., 2001	18	nicht angegeben	DII-DIII-linker	GEFS mit SMEI/MAE
W1204X	Sugawara et al., 2002	18	c.3578G>A	DII-DIII-linker	
R1213X	Fujiwara et al., 2003 (monozygote Zwillinge)	18	c.3637C>T	DII-DIII-linker	
V1215X	Nabbout et al., 2003a	18	c.3643-3644insTA	DII-DIII-linker	
S1231R	Fujiwara et al., 2003	18	c.3693T>A	DIIS1	
G1233R	Nabbout et al., 2003a	18	c.3697G>C	DIIS1	
L1235fsX1243/Splice site	Nabbout et al., 2003a; Wallace et al., 2003	IVS18	IVS18+1G>T	DIIS1-S2-linker	
R1245X	Nabbout et al., 2003a (2x)	19	c.3733C>T	DIIS1-S2-linker	
F1263L	Fujiwara et al., 2003	19	c.3789C>G	DIIS2	atypische SMEI
L1265P	Ohmori et al., 2002, 2003	19	c.3764T>C	DIIS2	

W1271X	Fujiwara et al., 2003; Ohmori et al., 2002, 2003	19	c.3782G>A	DIIS2	
W1284X	Fujiwara et al., 2003	19	c.3852G>A	DIIS3	
F1289del	Ohmori et al., 2002, 2003	19	c.3837-3839del CTT	DIIS3	
A1326P	Wallace et al., 2003	21	c.3976G>C	DIIS4	
V1353L	Wallace et al., 2001b	21	c.4057G>C	DIIS5	
L1355P	Fukuma et al., 2004	21	c.4034T>C	DIIS5	SMEIB
V1390M	Ohmori et al., 2002, 2003	21	c.4168G>A (im Original als c.3169 angegeben)	DIIS5-S6-linker	
R1407X	Sugawara et al., 2002; Fukuma et al., 2004	21	c.4189C>T	DIIS5-S6-linker	
W1408X	Fujiwara et al., 2003	21	c.4223G>A	DIIS5-S6-linker	
Splice-acceptor-site	Wallace et al., 2003	IVS22	IVS22-14T>G	DIIS5-S6-linker	
Splice acceptor site	Nabbout et al., 2003a	IVS22	IVS22-1G>T	DIIS5-S6-linker	
A1429fsX1443	Ohmori et al., 2002, 2003	22	c.4256-4260delCCACAinsATGTCC	DIIS5-S6-linker	
W1434R	Claes et al., 2003	22	c.4270T>C	DIIS5-S6-linker	
Q1450R	Ohmori et al., 2002, 2003	22	c.4319A>G	DIIS5-S6-linker	
Splice donor site	Claes et al., 2001; Wallace et al., 2003	IVS22	IVS22+1G>A	DIIS5-S6-linker	
L1461I	Nabbout et al., 2003a	23	c.4381C>A	DIIS5-S6-linker	
F1463S	Nabbout et al., 2003a	23	c.4388T>C	DIIS5-S6-linker	
S1516X	Sugawara et al., 2002; (3 Pat.)	24	c.4514C>A	DIIS-DIV	matern. Vererbung; FKGM

M1559del	Fukuma et al., 2004	26	c.4641-4643delAAT	DIVS5	
V1611F	Fujiwara et al., 2003	25	c.4831G>T	DIVS3	FKGM
Y1628X	Nabbout et al., 2003a	26	c.4388T>C	DIVS3	
P1632S	Fujiwara et al., 2003	26	c.4894C>T	DIVS3-S4-linker	
R1645X	Fukuma et al., 2004	26	c.4903C>T	DIVS4	
R1648C	Ohmori et al., 2002, 2003	26	c.4912C>T	DIVS4	
R1648H	Escayg et al., 2000b	26	c.4943G>A	DIVS4	
I1656M	Wallace et al., 2001b	26	c.4968C>G	DIVS4	
L1660fs1678	Sugawara et al., 2002; Claes et al., 2001	26	c.5010-5013delGTTT; c.4977-4980delGTTT	DIVS4-S5-linker	
F1661S	Claes et al., 2003	26	c.4982T>C	DIVS4-S5-linker	
P1668A	Nabbout et al., 2003a	26	c.5002C>G	DIVS4-S5-linker	matern. Vererbung
G1674R	Ohmori et al., 2002, 2003	26	c.4990G>C	DIVS5	
A1685D	Fujiwara et al., 2003	26	c.5054C>A	DIVS5	
F1692S	Fukuma et al., 2004	26	c.5045T>C	DIVS5	
Y1694C	Fukuma et al., 2004	26	c.5051A>G	DIVS5	
T1709I	Fujiwara et al., 2003	26	c.5126C>T	DIVS5-S6-linker	matern. Vererbung; FKGM
G1749E	Claes et al., 2003	26	c.5246G>A	DIVS5-S6-linker	
F1766del	Fukuma et al., 2004	26	c.5266-5268delTTT	DIVS6	SMEIB
F1765fsX1794	Fujiwara et al., 2003	26	c.5292-5293insT	DIVS6	
M1780T	Nabbout et al., 200a3	26	c.5339T>C	DIVS6	
Y1781C	Fukuma et al., 2004	26	c.5312A>G	DIVS6	

N1788fsX1796	Wallace et al., 2003	26	c.5363-5364insTGACTTT	C-terminal	
fsX1799	Gennaro et al., 2003	26	c.5240-5241insAA	DIVS6	matern. Vererbung
1803-1805delEFK	Nabbout et al., 2003a	26	c.5436-5444delGGAGAAGTT	C-terminal	
F1805X	Nabbout et al., 2003a	26	c.5414-5415delTT	DIVS6	
1807delMFYE	Fujiwara et al., 2003	26	c.5419-430delATGTTCTATGAG	C-terminal	
F1808L	Fujiwara et al., 2003	26	c.5422T>C	C-terminal	FKGM
W1812G	Fujiwara et al., 2003	26	c.5434T>G	C-terminal	
F1831S	Fujiwara et al., 2003	26	c.5492T>C	C-terminal	
M1841T	Annesi et al., 2003	26	c.5522T>C	C-terminal	SMEI in GEFS+
N18451846fsX1856	Claes et al., 2001; Wallace et al., 2003	26	c.5536-5539delAAAC	C-terminal	
G1880fsX1881	Ohmori et al., 2002, 2003	26	c.5610-5615delAGAGAT-insCTAGAGTA	C-terminal	
E1881D	Wallace et al., 2003	26	c.5643G>C	C-terminal	
R1886fsX1910	Nabbout et al., 2003a	26	c.5657delG	C-terminal	
E1890fsX1910	Nabbout et al., 2003a	26	c.5668delG	C-terminal	
R1892X	Sugawara et al., 2002; Fukuma et al., 2004	26	c.5674C>T ; c.5644C>T	C-terminal	
Q1904fsX1945	Sugawara et al., 2002	26	c.5682-5685insATCA	C-terminal	
T1909I	Ohmori et al., 2002, 2003	26	c.5696C>T	C-terminal	
R1912X	Fukuma et al., 2004	26	c.5704C>T	C-terminal	

Soweit in der Kommentarspalte nicht anders angegeben, handelt es sich um eine De-Novo-Mutation bei sporadischer SMEI.

Die Begriffe SMEIB, atypische SMEI und FKGM sind den angegebenen Originalartikeln entnommen und überschneiden sich in ihren Klassifikationskriterien weitgehend.

Tabelle A6: Klinische Leitsymptome mit hoher Korrelation zu SCN1A-Mutationen

Autoren/ Leitsymptom	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Gesamtfrequenz
1	5/5	9/9	7/7	5/5	29/30	25/26	33/33	keine Angabe	10/10	keine Angabe	123/125 0,99
2	keine Angabe	9/9	7/7	0/5	30/30	25/26	33/33	23/23	10/10	8/8	145/151 0,96
3	keine Angabe	2/9	keine Angabe	keine Angabe	16/30	keine Angabe	28/33	23/23	keine Angabe	6/8	75/103 0,73
4	1/5	8/9	7/7	2/5	24/30	16/26	33/33	8/23	10/10	8/8	117/156 0,75
5	4-5/5	6-7/9	4/7	4/5	keine Angabe	keine Angabe	16/33	23/23	10/10	6/8	73-75/100 0,73-0,75
6	0-1/5	9/9	7/7	1/5	29/30	25/26	33/33	keine Angabe	10/10	4/8	118-119/133 0,89
7	0-1/5	7/9	5/7	1/5	14/30	keine Angabe	28/33	20/23	keine Angabe	8/8	83-84/120 0,7
8	0-1/5	9/9	7/7	1/5	28/30	26/26	33/33	23/23	keine Angabe	keine Angabe	127-128/138 0,92

Leitsymptome:

- 1) normale Entwicklung vor Erstmanifestation (0,99)
- 2) Beginn febriler und/oder afebriler GTCS im 1. LJ (0,96)
- 3) Hemi-Grand mal (0,73)
- 4) Myoklonische Anfälle (0,75)
- 5) Temperatursensibilität (0,74)
- 6) Therapierefraktarität/Anfälle bis ins Erwachsenenalter (0,89)
- 7) Entwicklung einer Ataxie (0,7)
- 8) Mentaler Abbau (0,92)

Autoren der Veröffentlichung der genannten Frequenzen:

- 1) Annesi et al. (2003)
- 2) Claes et al. (2003)
- 3) Claes et al. (2001)
- 4) Escayg et al. (2001)
- 5) Fujiwara et al. (2003)
- 6) Fukuma et al. (2004)
- 7) Nabbout et al. (2003a)
- 8) Ohmori et al. (2002)
- 9) Sugawara et al. (2002)
- 10) Wallace et al. (2003)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katharina Ebach
Geburtsdatum/-ort: 21.06.1974 in Bochum
Eltern: Ulrike Ebach *22.03.1946; Grundschullehrerin
Dr. Jürgen Ebach *28.02.1945; Professor für ev. Theologie

Schulbildung

1980-1984: Grundschule, Bochum
1984-1993: Gymnasium am Ostring, Bochum
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr

1993-1994: Epilepsiekinderklinik Kidron, Bielefeld-Bethel

Studium

1994-2001: Humanmedizin an der Philipps-Universität, Marburg
1996: ärztliche Vorprüfung
1997: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2000: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2000-2001: Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Marburg
Wahlfach: Pädiatrie
2001: 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

01/2002-06/2003: ÄiP am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Klinikum der JLU Gießen (Abteilung Neuropädiatrie und Sozialpädiatrie – Sozialpädiatrisches Zentrum)
seit 07/2003: Assistenzärztin am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Klinikum der JLU Gießen (Abteilung Neuropädiatrie und Sozialpädiatrie – Sozialpädiatrisches Zentrum)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die an der Entstehung dieser Arbeit in irgendeiner Form beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Neubauer für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung.

Dem Leiter des humangenetischen Institutes des Universitätsklinikums Gießen, Herrn Professor Müller, danke ich für die großzügige Erlaubnis, einen Teil meiner Arbeit in seinen Laborräumen durchführen zu dürfen.

Ebenso möchte ich die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes in meinen Dank einschließen, die mir jederzeit freundlich und hilfsbereit entgegen kamen. Besonders gilt dies für Herrn Dr. Joos, der mich während der experimentellen Phase in die Labortechniken einführte und mir mit kompetenter Unterstützung und unermüdlicher Geduld bei allen Problemen und Fragen zur Seite stand.

Danken möchte ich auch Frau Garkisch und Frau Schellenberg, die mir bei der DNA-Sequenzierungen hilfreich waren.

Großer Dank gilt Herrn Professor Doose, der den Kontakt zu einigen seiner ehemaligen Patientinnen und Patienten herstellte, die die Kerngruppe der Studienpopulation bilden.

Ebenso danke ich Herrn Professor Stephani für die Zusendung von DNA-Proben aus seiner Sammlung und allen anderen Kolleginnen und Kollegen, die uns Blutproben ihrer Patientinnen und Patienten schickten, sowie den beteiligten Familien.

Und nicht zuletzt verspüre ich große Dankbarkeit gegenüber meiner besten Freundin und meiner Familie, die mich während aller Phasen dieser Arbeit ermutigend und unterstützend begleiteten.